Th. RONÉO 10

FACULTE de MEDECINE de PARIS

ANNEE 1966

N° 715

THESE

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(diplôme d'Etat)

par

HAYAT Bichi Maurice Marcel
Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 10 décembre 1932 à TUNIS

Présentée et soutenue publiquement le : 24 JUIN 1966

"LES ESSAIS EXPERIMENTAUX ET CLINIQUES EN CHIMIOTHERAPIE ANTICANCEREUSE"

1°) Expériences du "Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse".

2°) Rôle du Statisticien.

Président : Monsieur Pierre DENOIX, Professeur

Th. RONÉO 105 ex

FACULTE de MEDECINE de PARIS

ANNEE 1 9 6 6 N°

THESE

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(diplôme d'Etat)

par

HAYAT Bichi Maurice Marcel
Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 10 décembre 1932 à TUNIS

Présentée et soutenue publiquement le : 24 JUIN 1966

"LES ESSAIS EXPERIMENTAUX ET CLINIQUES EN CHIMIOTHERAPIE ANTICANCEREUSE"

1°) Expériences du "Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse".

2°) Rôle du Statisticien.

Président : Monsieur Pierre DENOIX, Professeur

24 JUIN 1986

A MA MERE

En témoignage de mon affection et de ma reconnaissance pour tous ses sacrifices.

A la Mémoire de MON PERE

A MON FRERE et A MA SOEUR

Qui m'ont encouragé avec affection.

A MON BEAU-FRERE, MA BELLE-SOEUR

A TOUTE MA FAMILLE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE D E N O I X

Professeur de la Chaire de Cancérologie Médicale
et Sociale

Directeur de l'Institut Gustave Roussy

Chirurgien des Hôpitaux

Officier de la Légion d'Honneur

Il a bien voulu nous faire l'honneur
de présider cette thèse,

Qu'il veuille bien accepter nos
respectueux remerciements.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544322_0018

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES M A T H E

Professeur de Cancérologie Expérimentale

Directeur de l'Institut de Cancérologie
et d'Immunogénétique

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a aidé de ses conseils,

Avec toute notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DANIEL S C H W A R T Z

Professeur de Statistique Médicale et d'Epidémiologie

Directeur de l'Unité de Recherches Statistiques
de l'I.N.S.E.R.M.

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse,

Nous le remercions de son enseignement et de son soutien moral.

A MES MAITRES D' INTERNAT

Monsieur le Docteur A. GERBAUX

Monsieur le Docteur R. MALLET

Monsieur le Docteur C. BACH

Monsieur le Docteur P. SERINGE

Monsieur le Professeur P. DENOIX

Monsieur le Professeur Agrégé M. AUSSANAIRE

Monsieur le Docteur A. HERRAULT

Monsieur le Professeur P. MOZZICONACCI

A MONSIEUR LE DOCTEUR R. FLAMANT

Chef de la Section Cancer
de l' I.N.S.E.R.M.

Notre Ami.

A MONSIEUR P. LAZAR

Ancien Elève de l'Ecole Polytechnique

Maître de Recherches à l' I.N.S.E.R.M.

Il nous a amicalement
conseillé,

Nous le remercions.

A TOUS CEUX QUI M'ONT AIDE POUR CETTE THESE.

- P L A N -

-<-

Introduction -

Essor de la Chimiothérapie Anticancéreuse.
Nécessité d'organisation.

I - LES ESSAIS EXPERIMENTAUX.

a) Description des tests.

1 - Tests in vitro
2 - Tests in vivo

b) Séquence des différents tests pour tout nouveau produit à étudier.

II - LES ESSAIS CLINIQUES.

a) Méthodologie des essais basée sur des tests statistiques :
les 2 variétés d'essai

1 - L'essai de type 1 : le produit a-t-il une certaine efficacité ?
2 - L'essai de type 2 : essai comparatif du nouveau produit par rapport au traitement habituellement utilisé.

b) Les premiers essais cliniques par un groupe directeur comprenant :

- une Section Leucémies et Hématosarcomes.
- une Section Tumeurs solides.

c) Les essais complémentaires par des groupes coopérateurs.

III - EXEMPLES DE RESULTATS OBTENUS.

a) Dans les Essais Expérimentaux.

b) Dans les Essais cliniques.

Conclusion -

-<-<-<-<-

Les progrès de la chirurgie et de la radiothérapie dans les affections cancéreuses restent pour le moment limités à la destruction de tumeurs localisées avec un envahissement ganglionnaire régional.

Ces traitements n'agissent pas sur la diffusion métastatique des tumeurs solides et ont peu d'applications dans les leucémies. Dans ces cas, la chimiothérapie tient une place majeure. Cette thérapeutique a pu être considérée comme une discipline empirique car, selon une logique un peu simpliste, les chercheurs ne sauraient étudier le traitement de la croissance cancéreuse avant d'en avoir établi la cause. Les résultats obtenus ces dix dernières années ont cependant condamné cette façon de voir et l'essor de la chimiothérapie anticancéreuse est justifié par les résultats obtenus.

Il faut cependant remarquer que la recherche de nouveaux agents chimiothérapiques se heurte à des difficultés particulières. La constitution chimique d'un produit ne permet pas de prévoir son action antitumorale. Même s'il est d'une série chimique connue comme active, la moindre modification de la molécule peut le rendre inactif et inversement, si le produit est d'une série réputée inactive.

Cette impossibilité de prévoir par la formule chimique rend nécessaire l'expérimentation du plus grand nombre de produits possible.

Les tests expérimentaux doivent être assez nombreux pour choisir au mieux les produits qui seront soumis aux essais cliniques, en sachant qu'un parallélisme absolu ne peut être espéré.

Nous nous proposons de décrire les différentes étapes de l'étude d'une nouvelle chimiothérapie anticancéreuse.

Après les tests "in vitro" et "in vivo" du laboratoire, les essais cliniques représentent la dernière étape.

Nous montrerons comment des résultats valables et rapides peuvent être obtenus. Les équipes de chercheurs doivent se grouper pour confronter

.../

leurs résultats. Les cliniciens de plusieurs centres ou hôpitaux entreprennent simultanément les essais cliniques. A chacune des étapes de ces essais expérimentaux et cliniques, les conseils du statisticien concourent à l'obtention de résultats ayant une rigueur scientifique. Une telle organisation fait de la chimiothérapie anticancéreuse, non plus un ensemble disparate de données mal établies, mais une véritable discipline scientifique ; elle a permis les progrès remarquables de ces dernières années.

L E S E S S A I S E X P E R I M E N T A U X

Les produits chimiques ayant une activité anticancéreuse sont à priori nombreux. Les tests expérimentaux ont pour objet d'éliminer rapidement et avec assez de certitude les produits qui n'ont aucun intérêt en clinique, soit parce qu'ils sont peu ou pas efficaces, soit parce qu'ils sont toxiques.

Nous décrirons la chaîne des tests de laboratoire habituellement utilisés en distinguant : a) les tests "in vitro", b) les tests "in vivo".

Nous verrons comment en pratique, se succèdent les différents tests

La dernière étape préclinique de pharmacologie toxique sera ensuite brièvement décrite.

- DESCRIPTION DES TESTS -

I - LES TESTS "IN VITRO" ET LA DETERMINATION DE LA DOSE LETALE 50 (DL 50) -

Dans cette première phase de l'expérimentation, l'activité antimitotique du produit est étudiée par trois tests "in vitro" donnant une réponse rapide. Parallèlement est déterminée la DL 50 qui permettra de passer à la phase suivante des tests "in vivo".

1°) Test effectué par la méthode de culture des tissus.

a) Le principe :

En étudiant l'action du produit sur la croissance "in vitro" de

.../

cellules se multipliant à l'état de monocellules, on évalue quantitativement l'inhibition de la croissance d'une part et la destruction éventuelle de la culture d'autre part.

b) Matériel et méthodes :

- La souche cellulaire utilisée est la souche K B isolée par EAGLE en 1955 d'un carcinome de la bouche.

- Le milieu de culture est le milieu d'EAGLE (15) avec la solution saline GEY ainsi que celle d'EARLE, à laquelle ont été ajoutés 10 mg/l de néomycine, 100.000 unités/l de pénicilline et 10 % de sérum bovin.

- Méthode de culture : on maintient les cellules à 37° C en flacons de KOLLE avec changement de milieu deux fois par semaine. Le transplant est effectué par trypsinition dans 0,25 % de trypsine (15) en solution saline ne contenant ni Ca ni Mg. Après 10 minutes de trypsinition à 37° C la suspension est comptée pour avoir 50.000 cellules par ml avec le milieu. Dans chaque flacon, sont mis 10 ml de suspension.

- L'évaluation de la croissance est faite par le décompte des cellules se trouvant en suspension par l'effet de la trypsine au moyen d'un compteur électronique qui a l'avantage d'une excellente reproductibilité des résultats.

- Le test :

Pour chaque test, on utilise cinq éprouvettes contenant 50.000 cellules dans 1 ml de milieu. Une des éprouvettes sert de "ligne de base à l'expérience" ; le nombre de cellules qu'on y compte est N.L.B.

Dans les quatre autres éprouvettes incubées pendant 48 heures sera évaluée la croissance cellulaire. Deux éprouvettes servent de contrôle et les deux autres contiennent la substance à un taux précis ; les trois concentrations choisies sont 1 µg/ml, 10 µg/ml et 100 µg/ml.

.../

Le niveau de croissance pour les contrôles est évalué par le rapport : $Ncc = \frac{N_{48}(c)}{N_{LB}} - 1$ où $N_{48}(c)$ représente le nombre de cellules par ml comptées après 48 heures et N_{LB}, le nombre de cellules de base au départ.

Le niveau de croissance pour les traités est $Nct = \frac{N_{48}\ t}{N_{LB}} - 1$

Le rapport $\frac{Nct}{Ncc} \times 100$ représente en pourcentage le niveau de croissance de traités par rapport aux contrôles.

Le pourcentage d'inhibition est $100 - \frac{Nct}{Ncc} \times 100$

Le pourcentage de destruction est $\left[\frac{N_{48}(t)}{N_{LB}} - 1 \right] \times 100$

On arrive ainsi à déterminer deux paramètres de cytotoxicité : l'inhibition et la destruction.

Les résultats sont exprimés ainsi :

Substance très active : inhibition $\geqslant$ 100 pour cent à une dose de 1 µg/ml

Substance active : inhibition $\geqslant$ 100 pour cent à une dose de 10 µg/ml

Substance inactive : inhibition $\leqslant$ 100 pour cent à une dose de 100 µg/ml

Le niveau de 50 pour 100 d'inhibition (In 50) et de destruction (De 50) peut être déterminé à la place de la DL 50 par la même méthode graphique que nous décrirons pour le test de la DL 50.

.../

2°) Test de culture des virus.

a) Le principe :

Sachant que la formation de tumeurs d'origine virale est directement ou indirectement liée à la multiplication de certains virus dans la cellule, le principe de ce test est de voir si un produit s'oppose à la multiplication de virus.

b) Matériel et méthodes :

Le test peut tout aussi bien être effectué avec des virus non-oncogènes dont la reproduction sur des cultures de tissu est plus facile.

Les virus choisis ont un long cycle de reproduction : virus de l'herpès, de la rougeole, virus ARN et ADN.

On utilise comme milieux de culture, des cultures cellulaires HELA. Dans chaque flacon contenant 10 ml de milieu de culture (solution de HANKE à 0,5 % d'hydrolysat de lactalbumine, 5 % de sérum de veau et des antibiotiques, on inocule le virus de l'herpès ou de la rougeole en suspension à une concentration fixe.

Dans des groupes de flacons, en même temps que le virus, on inocule le produit à tester à des dilutions de 0,1, 1, 10 et 100 µg/ml.

On a deux groupes de deux flacons comme contrôles : l'un des groupes ne reçoit que le virus, l'autre ne reçoit que le produit à étudier aux mêmes concentrations que dans les flacons avec virus "traités". Ce dernier groupe contrôle permet de juger de l'effet du produit seul sur la cellule.

c) Appréciation des résultats :

A un moment déterminé, on examine d'abord les flacons de contrôle, sans virus, mais avec le produit : ce dernier peut ou n'avoir aucune action

.../

cytopathogène, ou en avoir à partir d'une certaine concentration. On sait alors à quelles concentrations le produit n'a aucune action cytopathogène.

On examine alors les cultures inoculées par le virus et traitées aux concentrations correspondantes. Si une action cytopathogène est observée, elle est le fait d'une multiplication du virus et le produit est donc inactif.

Au contraire, si à une culture avec le produit et sans lésion cytopathogène, correspond une culture traitée et inoculée par le virus ne présentant aucun effet cytopathogène, on peut conclure que le produit est actif car il s'est opposé à la multiplication du virus.

3°) Test sur les cultures de mycètes.

C'est un test "in vitro" fait sur des cultures de Physarum Polycéphalum. Il permet d'étudier d'une part l'action inhibitrice des produits sur la synthèse protéique, et d'autre part de préciser à quel stade de la division cellulaire se produit l'action inhibitrice.

A - Inhibition de la croissance de cultures de "Physarum Polycéphalum" en suspension.

a) Le principe :

Le principe de ce test est l'évaluation de l'action inhibitrice des diverses substances sur la synthèse protéique dans des cultures de mycètes, le Physarum Polycéphalum

b) Matériel et méthodes :

A partir de 40 ml d'une culture en suspension à croissance logarithmique, on isole des microplasmes par centrifugation (2 minutes à 500 g), le sédiment étant redilué dans trois fois son volume de milieu frais.

.../

Des échantillons de 1,5 ml (correspondant à 8 mg de protéines) sont mis dans une série de flacons d'ERLENMEYER de 100 ml contenant 7,5 ml de milieu.

Deux échantillons de l'inoculum sont immédiatement centrifugés et gardés au froid, comme contrôle.

Les substances à étudier sont ajoutées dans les flacons sous forme de suspension ou de solution dans 1 ml d'eau distillée de façon à donner une concentration finale de 1, 10, 100 et 200 µg/ml. On a deux flacons pour chaque concentration. Une drogue de référence, la 5-Fluoro-désoxyuridine est incluse dans chaque expérience.

Toutes les cultures sont "mélangées" dans un agitateur à 23° C pendant 24 heures et sont secondairement centrifugées pendant deux minutes à 500 g. Les sédiments de ces cultures et les échantillons de contrôle sont lavés deux fois dans quatre fois leur volume de 0,25 d'acide trichloroacétique (T.C.A.) ou 0,5 de T.C.A. dans de l'acétone, et l'on mesure la synthèse protéique.

De façon à obtenir quelques informations sur le mécanisme d'action, on peut aussi mesurer le D.N.A. et le R.N.A.

c) Appréciation des résultats :

L'augmentation de la synthèse protéique dans les cultures avec la substance à tester est exprimée en pour cent de l'augmentation correspondante des témoins.

L'action inhibitrice d'une substance est caractérisée par la concentration qui inhibe 50 % de la synthèse protéique. Cette concentration est la dose inhibitrice 50 ou E.D. 50.

Les résultats sont classés comme suit :

E.D. 50	> 200 µg/ml	10 - 200 µg/ml	< 10 µg/ml
Efficacité	0	+	++

.../

B - Inhibition des mitoses dans des cultures de Physarum Polycéphalum.

a) Le principe :

Le principe de ce test est de donner quelques informations sur le mécanisme d'action des substances qui ont préalablement été jugées actives lors du test précédent.

La substance est ajoutée au milieu de culture de Physarum Polycéphalum à des stades différents du cycle de la division cellulaire. On juge aussi bien de l'effet sur le déroulement de la mitose que des altérations cytologiques observées sur les différentes phases de la mitose.

b) Matériel et méthodes :

Une série de macroplasmodes est préparée à partir d'une culture en suspension par fusion de microplasmodes sur papier filtre.

La première mitose a lieu six heures environ après la fusion. Les mitoses suivantes ont lieu à des intervalles de 9 à 12 heures.

A des temps variés après la deuxième mitose, les plasmodes sont séparés en quatre secteurs égaux et chacun d'entre eux est mis dans un milieu frais contenant la substance à tester. Il y a des secteurs qui sont dans un milieu normal de contrôle.

Systématiquement, les deux premiers secteurs plasmodiaux sont mis dans le milieu à tester immédiatement après le début de la seconde mitose.

La substance est ensuite mise en présence de deux secteurs plasmodiaux à chaque fois à des intervalles de deux heures, et ce jusqu'au début de la troisième mitose.

Pour une analyse plus détaillée, les intervalles peuvent être réduits à 60, 30 ou 15 minutes pendant des phases particulières de la division cellulaire.

.../

L'effet sur la phase et la morphologie de la mitose suivante est apprécié par un examen au microscope à contraste de phase.

c) Appréciation des résultats :

Au cours du cycle de la division cellulaire le D.N.A. nucléaire est synthétisé seulement dans les trois premières heures qui suivent la téloph[illegible].

La synthèse du R.N.A. est maxima au milieu de l'interphase et [illegible]ma lors de la mitose.

Aussi, les inhibiteurs de la synthèse de D.N.A. ne sont actifs que si administrés durant le premier tiers du cycle de la division cellulaire (période S) : tel est le cas de la 5-Fluoro-désoxyuridine.

A l'inverse, les inhibiteurs du R.N.A. et des protéines sont actifs aussi aux dernières phases (période G_2) : telles sont l'actinomycine D, la puromycine.

Les substances intervenant dans le métabolisme énergétique bloquent la division à n'importe quel stade : tel est le dinitrophénol.

Les effets sur la formation ou la fonction du fuseau mitotique provoquent un arrêt en métaphase : tel est l'actidion. Dès que le fuseau mitotique est formé à l'intérieur du noyau, certains des poisons du fuseau peuvent ne plus être actifs : telles sont la colchicine, la vincaleucoblastine.

C - Critiques des résultats obtenus par ce test "in vitro".

Ce test a laissé passer quelques substances tels des agents alkylants, des hormones stéroïdes et des antibiotiques qui avaient eu une action inhibitrice dans d'autres tests.

Cependant, la comparaison avec l'action inhibitrice sur les cellule[illegible]

.../

KB a montré le fait suivant : aux mêmes concentrations actives sur ces [illegible] nières, certains produits ne sont pas actifs sur le Physarum Polycéphal[illegible]. Il semblerait que le Physarum Polycéphalum serait plus sélectif, seulement sensible aux produits antitumoraux et au contraire peu touché par des agents non spécifiques. Cela ferait que ce test, simple et rapide, serait donc [illegible] intéressants permettant de sélectionner les produits.

4°) Détermination de la dose létale 50 (DL 50).

Le but de ce test est l'établissement de la toxicité générale du produit. Les doses à utiliser pour les tests "in vivo" en seront déduites.

a) Matériel et Méthodes :

Les animaux sont des souris "Swiss" ou des rats "Sprague Dawley".

Des groupes de six animaux chacun sont soumis à des doses de produit différentes. Les doses sont en progression géométrique de raison [illegible], c'est à dire que leurs logarithmes sont en progression arithmétique de raison 0,1.

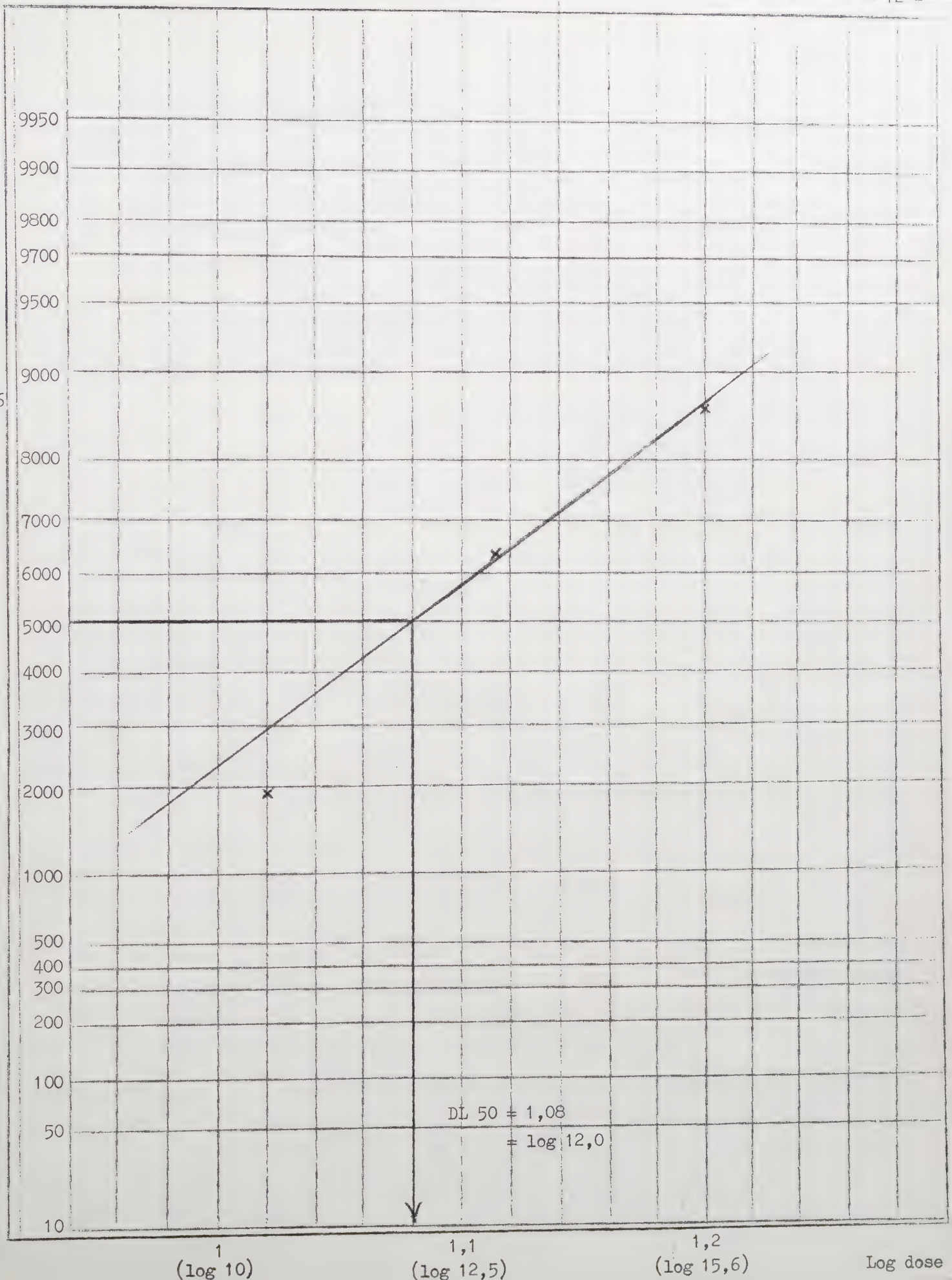
On fait une injection intra péritonéale quotidienne pendant 6 jours de suite ; le pourcentage de mortalité est évalué le septième jour.

b) Test :

La DL 50 est déterminée par une méthode graphique utilisant du papier gradué, en échelle logarithmique en abcisse et en probit en ordonnée.

Comme on le voit sur l'exemple graphique qui suit, la méthode est simple. On porte en abcisse le log-doses et en probit les décès observés pour chaque dose. Dans notre graphique on a successivement un décès sur six, quatre décès sur six et cinq décès sur six pour les trois doses croissant selon la règle énoncée. Au point 50 % de décès, on abaisse la verticale sur la ligne des abcisses et on lit directement la DL 50 qui est dans notre exemple la dose initiale multipliée par 1,08.

.../


9950
9900
9800
9700
9500
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
50
10
5/6
/6
/6
DL 50 = 1,08
= log 12,0
1
(log 10)
1,1
(log 12,5)
1,2
(log 15,6)
Log dose

II - TEST "IN VIVO" DE LA LEUCEMIE L 1210 -

A - PRINCIPE DU TEST -

Principe biologique :

La leucémie L 1210 est une leucémie lymphoblastique initialement induite par le méthylcholantrène sur une souris de la lignée DBA_2. Elle a été transmise par greffe sur des souris DBA_2 ou des F_1 $DBA_2 \times C_{57}$ Bl_6.

Le test consiste en l'administration du produit étudié à des souris ayant reçu une certaine quantité de cellules leucémiques. Si le produit est actif, il prolonge significativement la survie de ces souris.

Principe statistique :

Pour que ce test soit valable, il faut comparer la survie d'un groupe n_1 de souris témoins à un groupe traité n_2.

La survie de chaque souris est exprimée en jours et fractions de jours.

Pour chaque groupe, on a une moyenne de survie m_1 et m_2 ; il faut comparer la survie moyenne des deux groupes.

1°) Le test à utiliser est la comparaison de deux moyennes. (27)

Cette comparaison porte sur de petits échantillons de souris, en général inférieurs à 30 par groupe. Dans ce cas, le test statistique suppose que le caractère étudié est distribué dans la population d'où proviennent les échantillons selon des lois normales de même variance.

L'estimation commune de la variance est calculée par la formule :

$$s^2 = \frac{(x - m_1)^2 + (x - m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

.../

On procède alors au test statistique du t de STUDENT :

$$t = \frac{m_1 - m_2}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Ayant cette valeur de t, on se reporte à une table statistique du t. Si /t/ est inférieur à la valeur lue dans la table de t pour d.d.l. = $n_1 + n_2 - 2$ et le risque 5 %, la différence n'est pas significative ; dans le cas contraire, elle est significative et le risque indiqué par la table pour la valeur de /t/ trouvée, fixe le degré de signification.

On a intérêt à avoir une expérience la plus puissante possible, donc à rendre maximum $\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}$, autrement dit à avoir un nombre égal de souris dans les groupes traité et témoin.

Ayant appliqué le test ou peut alors conclure : si la différence est significative, on accepte le produit comme efficace, dans le cas contraire, on rejette le produit.

Une remarque est à faire au sujet du groupe témoin. Au lieu qu'il s'agisse d'un groupe ne recevant aucun traitement, il peut être intéressant selon les cas de le remplacer par un groupe traité par un produit connu comme ayant une efficacité sur la leucémie L 1210, tel le METHOTREXATE. Dans ce cas, l'expérience répondra à la question : le nouveau produit est-il meilleur que le produit classique, en l'occurrence le METHOTREXATE.

2°) Variantes du test de /t/.

Le test précédent n'est utilisable que si dans les deux groupes, toutes les souris sont mortes. Or il se peut que certaines souris du groupe traité survivent au-delà d'un certain délai d'observation.

Dans ce cas le test de /t/ de STUDENT n'est plus applicable tel que nous l'avons décrit.

.../

On peut a) soit attribuer aux souris qui ne sont pas mortes la survie maxima observée et appliquer le test précédent ; b) soit pratiquer un changement de variable : au lieu de prendre chaque survie x en jours, on utilise comme variable l'inverse de la survie $\frac{1}{x}$.

Dès lors si une souris ne meurt pas, on attribue à x une valeur infinie et $\frac{1}{x} = 0$. On rend ainsi maxima la valeur de la survie des souris ayant été "guéries" par le traitement.

3°) Test non-paramétrique.

Dans tous les cas où les conditions de distribution selon une loi normale et de variances égales ne sont pas remplies, il faut appliquer un test non-paramétrique. Nous utilisons le test W de WILCOXON. Dans cette méthode, on classe toutes les observations de l'expérience selon leur rang ; c'est-à-dire que la souris qui meurt la première a le rang 1, la seconde le rang 2 et ainsi de suite.

Le test W compare le rang moyen des souris traitées à celui des souris témoins. Ce test sera développé sur un exemple par la suite.

B - ORGANISATION DE L'EXPERIENCE -

1°) Matériel et méthodes :

On utilise des souris F_1 $DBA_2 \times C_{57}Bl_6$ agées de trois mois et des deux sexes. On leur fait une injection sous cutanée de 10.000 cellules leucémiques.

L'inoculum de cellules L 1210 est préparée de la façon suivante : la tumeur est prélevée, dilacérée aux ciseaux, filtrée sur coton stérile. La solution est numérée et ramenée à la bonne concentration par dilution dans du sérum.

.../

Le produit à étudier est administré à partir du lendemain. La dose pour un premier groupe est : 1/6e de la DL 50 chronique (établie sur 6 jours) chaque jour pendant 6 jours puis 1/12e de cette dose tous les jours pendant 14 jours. Un deuxième groupe reçoit 1/3 de la DL 50 chronique chaque jour pendant 6 jours puis le 1/6e de cette dose tous les jours pendant 14 jours.

La survie de chaque souris est exprimée en jours à partir du jour de l'injection de la leucémie L 1210.

2°) Les impératifs statistiques :

a) Nécessité d'avoir des témoins nouveaux pour chaque expérience.

Un groupe de souris témoins ne peut en effet servir à plusieurs expériences étant donné la variabilité qu'il peut y avoir. Cette variabilité tient à de multiples facteurs tels : la température du laboratoire, la position des cages d'animaux au laboratoire, la qualité de l'inoculum de cellules leucémiques, le facteur expérimentateur et la possibilité d'affection intercurrente chez les souris.

L'ensemble de ces facteurs peut modifier significativement la survie des souris d'une expérience à l'autre.

b) Le tirage au sort des animaux traités et témoins.

Théoriquement, les groupes traités et témoins devraient être mis dans la même cage. En pratique, il n'est pas facile de marquer chaque souris d'un groupe sans risque de fausser l'expérience. Aussi met-on dans des cages séparées les groupes traités et témoins. Il importe cependant que dans la population de souris de l'expérience, ce soit le "hasard" qui désigne les traités et les témoins.

Comme pour ce test de la leucémie L 1210 on a deux groupes traités pour un témoin, on peut se servir d'une table de permutation qui

.../

permet d'égaliser tous les 9 animaux. Par exemple, les nombres 1, 2, 3 seront témoins, les nombres 4, 5, 6 seront traités selon une dose, et les nombres 7, 8, 9 traités par la dose double.

c) Détermination du nombre de souris dans une expérience.

1) Pour déterminer ce nombre n, il faut se fixer un certain nombre d'impératifs :

- Le risque α ou risque de première espèce qui est la probabilité, si le produit n'est pas réellement efficace, de dire qu'il l'est. En général, on choisit α = 5 %. On peut cependant remarquer que 5 % est le risque maximum accepté pour dire que la différence est significative. En effet, dans le test /t/, nous avons vu que les tables nous permettent de donner la valeur du risque α en fonction de la valeur de /t/. Si le produit est très actif, /t/ sera grand et le risque très petit.

- Le risque β ou risque de deuxième espèce qui est la probabilité, si le produit est efficace, de dire qu'il ne l'est pas. Le choix de la valeur de ce risque dépend de la différence relative Dr qu'on désire ne pas méconnaitre lors de l'expérience. Autrement dit, D_r est la différence minima qu'on désire observer entre traitées et témoins. Cette différence est exprimée, non pas de façon absolue, mais relativement à la moyenne de survie des témoins, c'est-à-dire en pour cent d'augmentation.

$$D_r = 100 \times \frac{\text{Survie des traitées} - \text{Survie des témoins}}{\text{Survie des témoins}}$$

Si par exemple, on prend un risque β = 5 % et une différence relative D_r = 50 %, cela veut dire que sur 1000 produits ayant une efficacité d'au moins 50 %, on n'en laissera pas échapper plus de 5 %. Il est évident qu'un produit qui a plus de 50 % d'efficacité aura encore moins de chances d'être rejeté.

.../

- Il faut bien sûr aussi tenir compte de la variance σ^2 propre de la variable étudiée (ici la survie), qu'on peut caractériser, soit par son écart-type σ , soit mieux par $100 \frac{\sigma}{m}$ qui caractérise l'écart-type en pourcentage par rapport à m, durée moyenne de survie des témoins.

En utilisant, ce coefficient de variation CV, du critère (la survie) égale à $100 \frac{\sigma}{m}$, on inclut une mesure plus parlante pour le problème. En effet σ , écart-type de la moyenne m, exprime la variance de cette moyenne en nombre de jours, en valeur absolue.

Au contraire, $100 \frac{\sigma}{m}$, pour une valeur m de 11 jours par exemple exprime la variation en fraction de 11 jours.

2) La formule du nombre de sujets et l'utilisation des tables :

Le nombre de souris nécessaires à l'expérience est donné par la formule :

$$n = \frac{(\varepsilon 2 \alpha + \varepsilon 2 \beta)^2 \; 2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

où le dénominateur est la différence minima qu'on désire observer.

A partir de cette formule et des impératifs que nous venons de définir, risques α et β , différence relative D_r et à partir du coefficient de variation, il a été établi des tables permettant d'avoir directement le nombre n de sujets par groupe.

.../

D_r \ CV	10	15	20	25	30	35	40
10	22	49	87	136	195	266	
20	7	14	22	34	49	67	87
30	4	7	11	6	22	30	39
40			7	10	14	17	22

Tableau donnant les valeurs de n pour $\alpha = \beta = 5\ \%$

N.B. - On a tenu compte pour les petites valeurs de n du fait qu'il faut utiliser pour le test la table de t de STUDENT et non celle de la variable normale réduite.

β	5 %	10 %	20 %	30 %	40 %
	1	0,8	0,6	0,5	0,3

Tableau donnant le coefficient de multiplication pour différentes valeurs de β

1er exemple :

Si l'on désire que $\alpha = 5\ \%$, $\beta = 5\ \%$ et une D_r de 30 %, pour entrer dans la table il faut encore connaitre m, survie moyenne des témoins, soit 11 jours; σ , écart-type = 1,57

d'où $$CV = \frac{\sigma}{m} \times 100 = \frac{1,57}{11} \times 100 = 14$$

.../

En entrant dans la table pour la valeur voisine CV = 15 on voit qu'il faut prendre pour chacun des deux groupes 7 animaux.

2e exemple :

Avec les mêmes conditions que précédemment, mais β = 10 %, il faut multiplier 6 par 0,8 (coefficient donné par la table 2) soit 5 animaux par groupe.

De façon plus parlante, cela vent dire dans l'expérience ci-dessus que parmi les produits étudiés :

- s'ils ont une efficacité de 30 %, on n'en laissera échapper que 10 %.
- s'ils ont une efficacité supérieure, 80 % par exemple, on en laissera échapper un très faible pourcentage de moins de 1 %.
- s'ils ont au contraire une efficacité inférieure, soit 20 %, on en laissera échapper beaucoup plus soit 40 ou 50 %.

C - EXEMPLE DE TEST DE LA LEUCEMIE 1210 ENTIEREMENT REALISE -

Le produit à étudier est donné au responsable de l'expérience sous un numéro 01, ou 21, sans qu'il en connaisse la formule chimique. La DL 50 a été préalablement déterminée.

1°) Organisation de l'expérience :

a) Par un tirage au sort utilisant une table de permutation au hasard à 9 éléments, on constitue trois groupes de 10 souris. Ayant ainsi décidé que les numéros 1, 2, 3 forment le groupe témoin, les numéros 4, 5, 6 le premier groupe traité et 7, 8, 9 le deuxième groupe traité, la table nous indique dans l'ordre 5, 4, 9, 7, 1 ... donc la première souris ira dans le premier groupe traité, la deuxième également, la troisième dans le deuxième groupe traité, la quatrième dans le groupe témoin.

.../

b) A toutes les souris, sont injectées simultanément 10^4 cellules leucémiques.

A partir du lendemain, les groupes traités reçoivent le produit à étudier. Pour un groupe les doses sont de 40 mg/kg chaque jour pendant 6 jours puis 20 mg/kg chaque jour pendant les 14 jours suivants. Au deuxième groupe, les doses sont doublées. Chacune des cages contenant un groupe de souris est changé de place chaque jour.

2°) Les résultats ont été les suivants pour le groupe témoin et un groupe traité :

Groupe témoin n_1

	Survie en jours ou fraction de jours
Souris 1	16,0
" 2	16,2
" 3	16,5
" 4	16,8
" 5	18
" 6	18
" 7	18,1
" 8	18,6
" 9	18,9
" 10	25,1

Groupe traité n_2

	Survie en jours ou fraction de jours
Souris 1	16,9
" 2	17,1
" 3	22,2
" 4	23,4
" 5	23,5
" 6	23,6
" 7	23,8
" 8	24
" 9	24,2
" 10	24,6

m_1 (survie moyenne) = $18,22 \pm 0,78$ $m_2 = 22,33 \pm 0,86$

3°) Tests statistiques de comparaison de survies :

a) Le test paramétrique /t/ de STUDENT de comparaison de deux moyennes donne les résultats suivants :

.../

t = 3,35

D'après la table de /t/, on voit que la différence est très significative à plus de 1 %.

b) Le test non-paramétrique est réalisé comme suit :

Valeur survie en jours	16	16,2	.....																	25
Rang du décès	1	2	3	4			7	8	9	10	11									20

Rang du décès				5	6							12	13	14	15	16	17	18	19	
Valeur survie en jours				16,9	17,1							22,2	.....					24,2	24,6	

Somme des rangs
observée pour les témoins : 1 + 2 + 3 + 4 + 7 + 8 + 9 + 10 + 1 = 75

Somme des rangs
attendue pour les témoins : $\frac{n_1 (N + 1)}{2} = \frac{10 (20 + 1)}{2} = 105$

La différence entre ces deux sommes est 105 - 75 = 30

Variance de la somme des rangs : $\frac{n_1 \ n_2 (N + 1)}{12} = \frac{10 \times 10 \times 21}{12} = 175$

$$/t/ = \frac{30}{\sqrt{175}} = \frac{30}{13,2} = 2,27$$: la différence est significative.

4°) Conclusion :

Dans les conditions de l'expérience, le produit peut être considéré comme actif prolongeant de façon très significative la survie de souris ayant une leucémie L 1210.

.../

III - LES AUTRES TESTS "IN VIVO" -

Ce sont des tests qui sont faits sur des tumeurs transplantées et sur des leucémies à virus.

L'action des produits sur la réaction immunitaire et en association avec l'action des radiations ionisantes seront ensuite envisagées.

1°) Sarcome 180.

a) Le principe du test :

On fait une implantation sous-cutanée d'un fragment de tumeur à deux groupes de souris traitées et témoins et on compare le poids moyen des tumeurs transplantées.

b) Matériel et méthodes :

On utilise des souris de la souche Swiss des deux sexes ayant un poids moyen de 18 à 22 g. Pour chaque groupe, on compte 10 souris; avec un trocart, on fait une implantation sous-cutanée dans la région axillaire droite d'un fragment de tumeur ayant un poids moyen de 25 mg.

La stérilité absolue est nécessaire pour isoler et fragmenter la tumeur, ce qui est fait dans une boite de Pétri avec 300 unités par ml de Pénicilline et 300 γ/ml de Streptomycine.

Le produit à étudier est administré par voie intrapéritonéale 10 jours après l'implantation de la tumeur.

Les doses sont pour chacun des groupes 1/3, 1/6, et 1/12 de la DL 50 chronique. Cette dose quotidienne est donnée 6 jours de suite.

.../

c) Le test :

Au septième jour, on établit le poids moyen des animaux et le poids moyen des tumeurs dans chacun des groupes.

On compare par le test statistique du /t/ de STUDENT les poids moyens des tumeurs.

On exprime les résultats en pourcentages de poids des tumeurs chez les traitées par rapport aux contrôles.

Pour une inhibition de 0 à 25 %, résultat négatif,
Pour une inhibition de 25 à 50 %, résultat significatif,
Pour une inhibition $\geqslant$ 50 % , résultat très significatif.

d) Test des leucocytes :

Parallèlement au poids de la tumeur, le septième jour, on compte le nombre de leucocytes pour déterminer l'action du produit sur le taux des leucocytes. La formule leucocytaire est établie par la méthode différentielle directe en cellule donnant le nombre de polynuclées et de mononuclées (19).

2°) Adéno-carcinome -

a) Le principe :

L'implantation sous-cutanée de cellules obtenues par un broyat de la tumeur et une filtration sur gaze stérile détermine chez une souris une tumeur à type d'adéno-carcinome. Le passage de la tumeur se fait tous les 14 jours.

.../

b) Matériel et méthodes :

Les animaux receveurs sont des souris C_{57} $Bl/_{6}$. On utilise 10 animaux par test avec un nombre égal de témoins.

A l'aide d'un trocart, on implante dans la région axillaire et des deux côtés 10^6 cellules, les dilutions étant faites dans du soluté salin isotonique.

La dose du produit à étudier est administrée aux mêmes doses que pour le test du Sarcome 180.

c) Le test :

Au quatorzième jour, les animaux sont sacrifiés et le poids de la tumeur évalué en mg.

Le test statistique utilisé est la comparaison des deux moyennes de poids des tumeurs.

Comme il y a un échantillon faible dans chaque groupe (10 souris), on utilise le test de /t/ de STUDENT aux conditions indiquées dans le test de la leucémie 1210 : égalité des variances et distribution normale. On aura comparé également le poids moyen des souris des deux groupes au début et en fin d'expérience.

Les autres tumeurs sur lesquelles est étudié le produit sont :

- la Tumeur M.P.C. : plasmocytaire à γ-globulines,
- la Tumeur plasmocytaire ascitique à B_2 A globulines (A.D-5-PC),
- la Tumeur B.P. 8.

Le principe de ces tests est le même que celui précédemment décrit pour les tumeurs transplantées.

.../

3°) L'effet antiviral "in vivo" sur la leucémie de Ch. FRIEND.

Les animaux utilisés sont des souris SWISS ou F_1 de DBA/$_2$ × C BA.

Les souris reçoivent le virus de Ch. FRIEND à 35 % du poids de la rate, avant, pendant ou après la chimiothérapie.

Elles reçoivent une fois par jour pendant 6 jours, le 1/6 de la DL 50.

Le principe statistique et l'organisation de l'expérience sont semblables à ceux décrits pour la leucémie L 1210.

4°) Les Essais immunologiques.

a) Principe des tests :

Il est de déceler une action possible de l'administration des produits étudiés sur les défenses immunitaires de l'organisme normal.

Le premier problème est le choix des stimuli antigèniques utilisés pour étudier l'action des produits. D'après des études sur la souris (5, 18), trois types essentiels de cellules peuvent proliférer selon le type de la stimulation antigénique.

Aussi a-t-on choisi trois stimuli : la greffe de peau allogénique à laquelle correspond une prolifération histiocytaire ; l'injection d'albumine hétérologue qui induit la prolifération de lymphocytes hyperbasophiles et l'injection de virus poliomyélitique vivant qui entraîne la prolifération de plasmocytes vrais. Ces trois types de tests doivent permettre de déceler des actions préférentielles d'un produit donné sur ces trois types de réaction cellulaire.

.../

Le deuxième problème est la modalité d'administration du produit étudié : doses et dates par rapport aux stimuli antigéniques.

La dose Létale 50 (DL 50) chronique établie sur 6 jours étant par ailleurs déterminée pour chaque produit étudié, les doses sont : le 1/6 de la DL 50 chaque jour pendant 6 jours, puis le 1/12 de la DL 50 un jour sur deux pendant 14 jours. Un groupe d'animaux est immunisé avant ce traitement et l'autre après.

5°) Immunisation contre une protéine hétérologue.

a) Matériel et méthodes :

On utilise des souris SWISS de 2 à 4 mois. L'immunisation est réalisée comme suit : du jour un au jour 12 on fait, à raison d'une tous les 3 jours, 4 injections intradermiques de 0,1 ml d'une solution d'albumine humaine dont la concentration est de 10 mg/ml.

A partir du jour 20, l'immunisation de ces souris est étudiée comme suit : injection intraveineuse de 30 microcuries d'albumine humaine marquée à l'I_{131}. La radioactivité de 0,1 ml de sang total est mesurée au compteur à scintillations a) 24 heures avant l'injection - b) 24 heures après l'injection et toutes les 24 heures pendant 10 jours. La décroissance de la radioactivité est mesurée par rapport à celle établie 24 heures après l'injection.

b) Essai des produits :

On injecte aux doses indiquées, le produit étudié à deux groupes de 10 souris. Il y a au total 4 groupes de 10 souris : 1) un groupe non immunisé et non traité, 2) un groupe immunisé non traité, 3) un groupe dont l'immunisation est commencée le jour de la première injection du produit, 4) un groupe dont l'immunisation est entreprise deux jours après la dernière injection du produit.

.../

c) Appréciation des résultats :

L'efficacité du produit sur l'immunisation est jugée sur la clearance de l'antigène marqué.

Si la clearance est basse, c'est que les réactions immunitaires sont déprimées et inversement. On estime indirectement cette clearance par la radioactivité restante du sang mesurée pendant 10 jours. Autrement dit, si la radioactivité du sang reste élevée, c'est que la clearance est basse, que les réactions immunitaires sont diminuées et que le produit est actif.

Le test statistique utilisé pour valider les résultats est le test non-paramétrique W de WILCOXON que nous avons décrit pour le test de la leucémie L 1210. Au troisième et quatrième jour de mesure de la radioactivité, on classe par rangs les souris d'un groupe traité et du groupe témoin immunisé, selon le nombre de coups enregistrés par l'appareil à seintigraphie.

6°) Immunisation contre le virus de la poliomyélite.

a) Matériel et méthodes :

On utilise des souris SWISS de 2 à 4 mois auxquelles, par voie intradermique, on fait en 15 jours six injections de 0,1 cm^3 d'une solution à 100^6 de la dose cytotoxique 50 par cm^3 de virus de la souche 2 MEF_1, cultivée sur cellules KB jusqu'à leur lyse, non filtré et centrifugé 1/4 d'heure à 5000g. Pour évaluer l'immunisation, 8 jours après la dernière injection immunisante, 0,1 cm^3 de sérum est prélevé par ponction du sinus caverneux. La teneur en anticorps est appréciée par la méthode cinétique de LEPINE et ROGER. Les anticorps sont exprimés par la dose de proctection 50 pour cent.

b) Essai des produits :

La DL 50 sur 6 jours du produit à étudier est connue. Les doses sont celles de tous les tests immunologiques avec un groupe traité avant et l'autre après l'immunisation.

.../

c) Appréciation des résultats :

Le sérum des 10 souris de chaque groupe est examiné le même jour. Selon qu'il y a ou non un taux d'anticorps suffisant on exprime l'immunisation comme positive ou négative.

On compare les proportions d'immunisation négative et positive entre les témoins et les traités.

	Témoins	Traités
Résultats positifs	n_1	n'_1
Résultats négatifs	n_2	n'_2
Total	10	10

Le tableau ci-dessus représente la façon dont sont donnés les résultats par l'expérimentateur.

Le test statistique à appliquer est celui qui étudie la liaison de deux caractères qualitatifs qui sont ici l'immunisation et le traitement. En général, c'est le test du χ^2. Dans ce cas particulier où les effectifs théoriques sont inférieurs à 5, il faut faire la correction de YATES ou utiliser la méthode plus exacte de FISHER.

Un exemple numérique peut être donné.

.../

	Témoins	Traités	Total
Non immunisés	0 (2,5)	5 (2,5)	5
Immunisés	10 (7,5)	5 (7,5)	15
Total	10	10	

$$\chi^2 \text{ (Yates)} = 4 \quad \frac{6}{7,5} + \frac{2}{7,5} = 4,26$$

La différence est significative avec un risque α de 4 %, donc le produit a inhibé efficacement l'immunisation des souris.

7°) Immunisation contre un greffon allogénique.

a) Matériel et méthodes :

Les souris utilisées sont :

1 Des souris F_1 : CBA × C_{57}Br (même locus H_2 k) qui forment le groupe receveur.

2 Des souris C_3 H (H_2 k) qui forment le groupe donneur.

La peau est prélevée sur la queue et greffée sur le dos, elle est maintenue par un pansement enlevé au septième jour.

b) Test de l'immunisation :

A partir du jour 1 de la greffe, l'état du greffon est apprécié chaque jour par deux observateurs ignorant à quel groupe appartient l'animal. Le rejet complet est compté du jour où la greffe prend un aspect d'escarre noirâtre.

.../

c) L'essai des produits :

La DL 50 chronique sur 6 jours est connue. Les animaux sont répartis en trois groupes de 10 : 1) un groupe immunisé et non traité, 2) un groupe immunisé traité après l'immunisation, 3) un groupe immunisé traité avant l'immunisation.

d) Appréciation des résultats :

Le groupe 1 constitue le groupe témoin pour lequel on détermine la moyenne de survie du greffon en jours. Les groupes 2 et 3 sont les groupes traités que l'on compare au témoin. Il s'agit de faire une comparaison des survies moyennes en jours chez les traités et les témoins.

Comme il n'y a que 10 souris par groupe, donc des échantillons faibles, on utilise le test /t/ de STUDENT. Si la différence entre traités et témoins est significative, on peut dire que le produit étudié a eu une action immuno-dépressive. Il a significativement prolongé la survie du greffon.

8°) Les essais radiobiologiques :

a) Principe du test :

Lorsqu'on associe une chimiothérapie et une radiothérapie sur une tumeur, les effets observés sont variables.

Si l'on adopte une attitude explicative, pour étudier cette association, il faudrait savoir si le produit chimique associé à l'irradiation a eu l'un des effets suivants : radio-sensibilisation, potentialisation, addition ou antagonisme. Au sens strict du terme en pharmacologie, il n'y a pas de produits connus qui soient radiosensibilisateurs en dehors de l'oxygène (33). Certains produits agissent selon les autres modalités.

En se plaçant d'un point de vue pragmatique, on cherche à répondre à la question suivante : l'adjonction d'une chimiothérapie à l'irradiation

.../

est-elle meilleure que l'irradiation seule, et peut-on l'évaluer quantitativement? C'est à cette question que répondent les tests utilisés. Secondairement, on essaie d'interpréter le mode d'action : addition, potentialisation ou sensibilisation.

b) Les tests sont faits 1) "in vitro" sur des cultures de cellules, 2) "in vivo" sur des souris.

1) Essais sur les cultures "in vitro" :

Le groupe témoin est constitué par un nombre fixe de cellules irradiées à 4 doses de 200, 400, 600 et 800 rads.

Le groupe traité est incubé 3 heures avant l'irradiation avec le produit étudié, aux 3 concentrations différentes. On évalue quantitativement dans chaque groupe la destruction cellulaire.

2) Essais "in vivo" sur les souris :

Le groupe témoin est irradié et comprend 10 souris. Dans chaque groupe traité, les souris reçoivent le produit à la même dose 5 ou 30 minutes avant l'irradiation qui est faite pour chaque groupe à 3 doses différentes de 650, 550 et 450 rads.

IV - LA PHARMACOLOGIE PRECLINIQUE -

Lorsqu'un produit s'est montré actif lors des essais expérimentaux, la dernière étape qui précède les essais cliniques est l'étude pharmacologique. Elle se fait sur les animaux de laboratoire, rongeurs et chiens, mais aussi plus récemment sur les singes où la corrélation avec la toxicité humaine est plus forte.

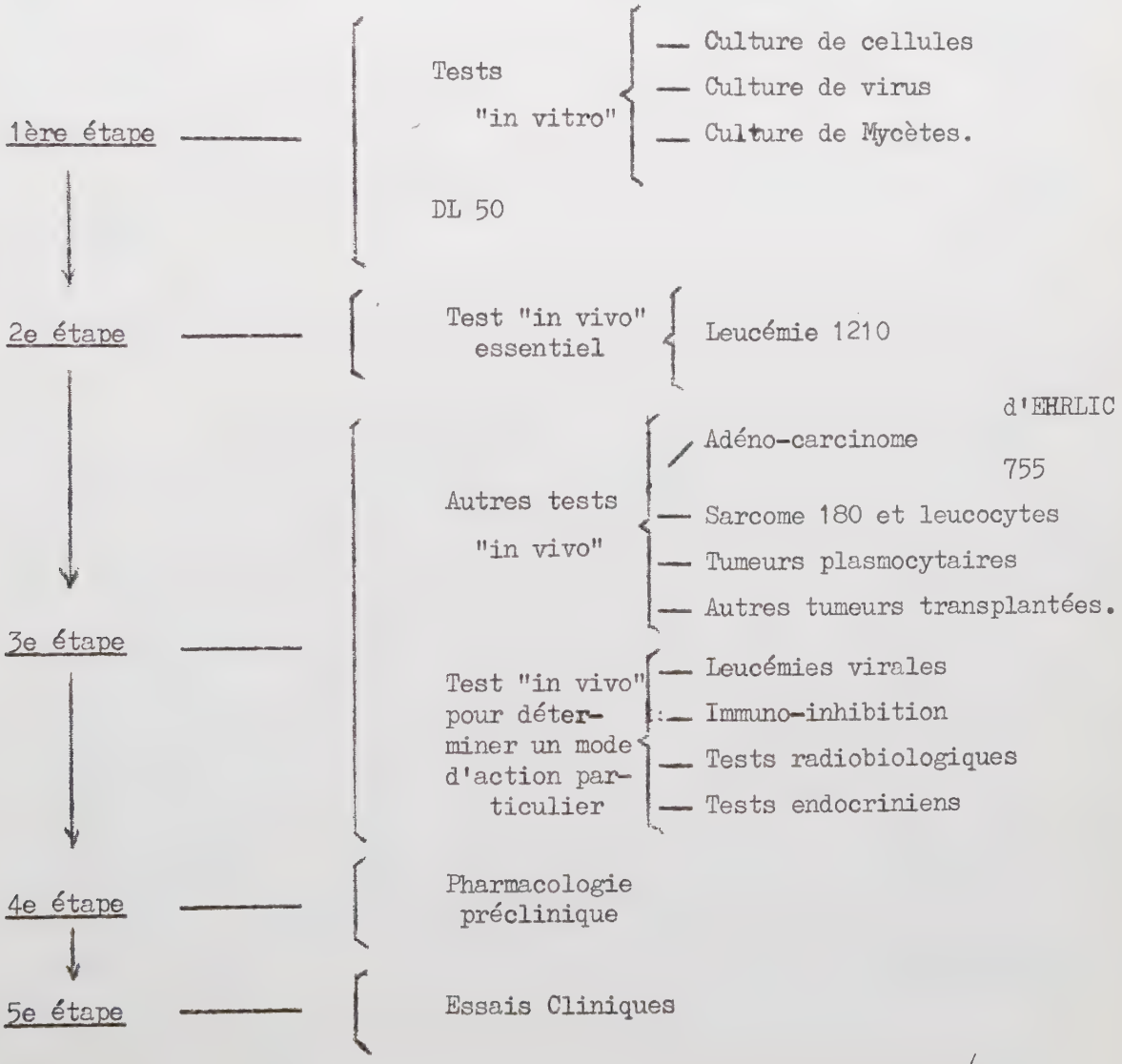
La toxicité aigue et la dose Létale 50 aigue est déterminée avec diverses voies d'administration. La dose Létale 50 chronique est connue. On détermine ensuite : a) l'action locale du produit sur les tissus par injection intramusculaire et sous-cutanée et examen histologique des tissus,

.../

b) l'action générale sur l'appareil cardiovasculaire, sur la respiration et le système nerveux central avec une dose unique et plusieurs doses répétées, c) l'action sur les fonctions hépatique et rénale, et sur les éléments figurés du sang, d) lorsque des animaux meurent, une autopsie est faite pour déterminer notamment la cause du décès.

- SEQUENCE DES TESTS EXPERIMENTAUX -

Le schéma ci-dessous représente la succession des différents tests décrits.



.../

- CONCLUSION -

En pratique, l'objectif principal des essais expérimentaux est l'étude du plus grand nombre possible de produits dans les délais les plus courts. Ceci ne peut être réalisé si chaque produit est étudié par tous les tests que nous avons décrits qui sont déjà très nombreux, bien qu'incomplets. Dès lors, ne peut-on sélectionner les tests les plus intéressants ? autrement dit y-a-t-il un ou deux tests qui permette de prévoir, en cas de réponse positive que le produit étudié aura une activité clinique. Cette question ne peut être résolue que par des faits d'observation. Voici les résultats de travaux récents (12) où le problème a été abordé de façon rétrospective. On dispose actuellement d'un large éventail de produits chimiques qui sont actifs en clinique. On peut voir dans quels tests expérimentaux, ces produits avaient donné un résultat positif.

Les résultats pour les leucémies sont représentés sur le tableau ci-dessous.

	Activité "in vivo"	Activité clinique	
Nom du Produit	Activité sur la leucémie L 1210 par rapport au Méthotrexate quantifié 100	Leucémie Aigue	
		Lympho-blastique	Myélo-blastique
Méthotrexate	100	+	0
Cytoxan	100	+	0
Méthyl-GAG	60	0	+
6-Mercaptopurine	50	+	+
Vincristine	17	+	0
Prednisone	11	+	0

(D'après GOLDIN) (12)

.../

Il apparait sur ce tableau, que deux produits actifs en clinique (Vincristine et Prednisone) auraient été jugés inactifs sur la Leucémie 1210.

L'étude de 20 produits actifs en clinique sur les tumeurs solides a été faite. En se reportant à 12 tests expérimentaux, les plus sensibles, on a pu établir une corrélation entre activité clinique et activité en expérimentation. Les 20 produits se répartissaient ainsi quant à leur activité selon le tableau suivant.

Nom du Test	Nombre de produits actifs	Nom des Produits
L 1210	16	Cytoxan, 5 FU ... et autres produits actifs sauf :
Carcinosarcome de Walker 256	3	Myleran, Prednisone, Demecolcine.
Ascite de Dunning	1	Uréthane

On remarquait aussi que chaque produit actif sur la L 1210 était aussi actif sur au moins un autre test expérimental. On voit donc que le test de la L 1210 laisse échapper peu de produits.

Les auteurs ont donc fait une étude exhaustive de tous les produits utilisés en chimiothérapie anticancéreuse clinique. 88 produits ont une certaine efficacité. Cependant, certains d'entre eux étant peu actifs, des critères d'efficacité ont été retenus : a) pour les leucémies aigues, rémission clinique et hématologique complète dans 20 % des cas, b) pour les tumeurs solides, réduction d'au moins 50 % de leur dimension. Il ne reste que 45 produits répondant à ces critères. Leur efficacité lors des tests expérimentaux est résumé dans le tableau suivant.

.../

	Nombre de produits actifs	Nom des Produits
Leucémie L 1210	33	Tous les produits les plus actifs autres que ceux ci-dessous.
Walker 256	9	Myleran - Prednisone - Oxylone DON - Nitromine - Streptonigrine - Demécolcine Dyhydromylone - Hexaméthylmélamine.
Dunning Ascite	1	Uréthane
Carcinome 755	2	Mythromycine Pactamycine
Autre	0	
Total	45	

La conclusion de ces travaux (12) est qu'en essayant les produits sur la leucémie L 1210 et sur le carcinosarcome de Walker au minimum, on ne laisse échapper pratiquement aucun produit actif en clinique.

Remarquant, que parmi les 13 produits que la L 1210 avaient laissé échapper, la Prédnisone et deux produits seulement avaient un réel intérêt clinique, le Myleran et la Vincristine, nous avons pensé que l'attitude suivante était justifiée : le premier test "in vivo" effectué est celui de la leucémie L 1210. Si la réponse est positive, on peut passer aux essais cliniques après une étude pharmacologique rigoureuse, notamment si le produit est d'une série chimique nouvelle. Si la réponse est négative, on poursuit les tests "in vivo" sur un sarcome et un adénocarcinome au moins avant de rejeter le produit. Les autres tests ne seraient faits que dans des cas particuliers.

.../

L E S E S S A I S C L I N I Q U E S

Si les essais faits au laboratoire "in vitro" et sur l'animal ont montré qu'un produit a une certaine activité antimitotique, aucune conclusion valable ne peut être obtenue tant que le traitement n'a pas été essayé sur les malades eux-mêmes.

Nous décrirons les essais cliniques en envisageant successivement la méthodologie de ces essais puis leur réalisation pratique.

- METHODOLOGIE DES ESSAIS CLINIQUES : DESCRIPTION DE DEUX TYPES D'ESSAIS -

L'appréciation des effets d'un traitement a de tout temps fait l'objet des soins les plus attentifs, mais elle a conservé jusqu'à une époque toute récente un caractère empirique et individuel.

Un nouveau médicament était-il efficace sur un ou deux malades, on concluait hâtivement qu'il agissait sur la maladie, sans s'assurer par exemple que le médicament avait pu être donné à une phase spontanément résolutive de la maladie.

A l'inverse, un produit pouvait être rapidement condamné parce qu'il avait donné deux ou trois echecs successifs.

C'est depuis peu d'années, pratiquement depuis 1940 avec l'apparition des antibiotiques que l'efficacité d'un traitement a été appréciée selon

.../

des méthodes rigoureuses permettant d'avoir des conclusions valables.

C'est cette méthodologie qui est exposée dans ses très grandes lignes avec une référence particulière aux problèmes de la cancérologie.

I - L'ESSAI SIMPLE : ESSAI DU TYPE 1 -

Le but de cet essai est de répondre à la question : "Tel agent chimiothérapique est-il efficace dans telle tumeur maligne ou telle leucémie ?

A - PRINCIPE DE L'ESSAI -

Supposons un malade ayant une leucémie en poussée évolutive tel que l'on puisse affirmer l'impossibilité d'une rémission spontanée. Admettons qu'après administration de la substance à étudier, une rémission se produise, la substance pourra alors être déclarée responsable de ce succès. Si, sur une série de malades, un seul succès est observé, la substance a une certaine efficacité. Cependant, si l'efficacité est faible, on risque d'être obligé de traiter un grand nombre de malades avant d'observer un succès ; par ailleurs, la substance ne sera pas suffisamment intéressante pour avoir mérité cette longue série.

Il faut donc dans ce type d'essai déterminer le nombre de malades tel que, si on arrête l'essai après une série d'échecs, on ne risque pas de laisser échapper un produit ayant une certaine efficacité.

B - DETERMINATION DU NOMBRE DE SUJETS -

Elle va dépendre du choix de deux éléments :

- Le pourcentage d'efficacité minimum d'une substance qu'on désire ne pas méconnaître.

.../

- Le risque β, qui est la probabilité qu'on a de laisser échapper un produit qui aurait en fait le minimum d'efficacité recherché.

Ayant fixé ces deux données, on peut calculer le nombre minimum de sujets pour un essai. Ainsi, par exemple, pour un risque β de laisser échapper un produit de 10 % et une efficacité minima à ne pas méconnaître de 15 %, la série doit compter 15 malades.

Pour déterminer ce nombre, on calcule les chances d'avoir des échecs successifs pour chacun des patients si le produit a une efficacité réelle de 15 %.

Patients successifs	Probabilité d'échecs chez chacun des malades successifs	
n° 1	0,85 (85 %)	
n° 2	0,85 × 0,85	0,72
"	"	
"	"	
"	"	
"	"	
"	"	
15	# 0,10	

Au quinzième malade donc, si le produit a au moins 15 % d'efficacité, il n'y a plus qu'une probabilité de 10 % qu'il donne encore un échec.

A l'inverse, sur 15 cas successifs, on a 90 chances sur 100 d'observer un ou plusieurs succès si le produit a une efficacité minima de 15 %.

.../

Selon le risque β consenti et l'efficacité minima qu'on désire ne pas méconnaître, le tableau ci-dessous a pu être établi.(39)

Risque d'erreur	Efficacité thérapeutique en %									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
5 %	59	29	19	14	11	9	7	6	6	5
10 %	45	22	15	11	9	7	6	5	4	4

(D'après E. A. GEHAN).(39)

C - CRITIQUES DE CE TYPE D'ESSAI -

Un essai de ce genre est particulièrement simple : il ne demande qu'un petit nombre de malades, et pas de témoins. Il faut cependant en connaître les limites.

En premier lieu, il faut remarquer qu'on ne peut préciser le degré d'efficacité réelle qui demanderait un nombre plus important de sujets. Dans cet essai du type 1 d'ailleurs, le fait d'avoir un succès ne signifie pas que l'efficacité du produit est d'au moins 15 % ; elle peut être réellement inférieure ou supérieure. Cela permet d'écarter assez rapidement les substances qui n'ont probablement pas l'efficacité minima qu'on voudrait ne pas méconnaître.

Il s'agit donc d'un essai préliminaire ; l'attitude ultérieure dépend de la nature chimique de la substance étudiée et de la maladie qui a

.../

fait l'objet de l'essai.

En second lieu, cet essai suppose la possibilité du point de vue éthique d'administrer au malade un traitement inconnu, donc de le priver de traitements connus, ce qui signifie ou qu'il n'en existe pas ou que le malade leur est résistant.

La troisième réserve est que ce type d'essai ne peut répondre à la question : telle substance nouvelle est-elle plus efficace que telle autre ? Il faut faire un essai comparatif pour répondre à cette question.

II - L'ESSAI COMPARATIF : ESSAI DE TYPE 2 -

A - POSITION DU PROBLEME -

Cet essai a pour but de répondre à la question : "Telle chimiothérapie nouvelle est-elle meilleure que le traitement classique dans une maladie donnée" ?

Il faut comparer un groupe de malades "traité" soumis au traitement nouveau qu'on se propose d'éprouver et un groupe témoin recevant le meilleur traitement classique connu à l'époque de l'essai.

Remarquons d'emblée que la méthodologie que nous allons décrire s'applique aussi bien à la comparaison de deux schémas thérapeutiques quelle que soit leur modalité à condition qu'on l'ait bien définie. La comparaison pourra ainsi porter : a) soit sur deux chimiothérapies entre elles - b) soit sur une polychimiothérapie avec une autre - c) soit sur une modalité d'administration nouvelle et celle habituellement utilisée - d) soit enfin l'association simultanée ou successive d'une chimiothérapie à un autre traitement majeur, chirurgie ou radiations.

.../

B - PRINCIPE DE LA METHODE -

Imaginons que la comparaison porte sur la proportion de rémissions dans une leucémie et donne le résultat suivant : 30 % de rémissions dans le groupe témoin, 50 % dans le groupe "traité". L'avantage du groupe "traité" ne peut être tenu pour réel que si on peut prononcer un jugement de signification et un jugement de causalité (46).

Le jugement de signification :

C'est à un test statistique simple de comparaison de deux pourcentages que l'on recourt pour le porter.

C'est le test du χ^2 qui permet de dire si la différence observée est significative ou non, et précisant en cas de réponse positive la probabilité qu'on a de se tromper, à savoir le risque α.

Le jugement de causalité :

Il permet, si la différence est significative, de dire qu'elle est liée uniquement à la différence des deux traitements. Il faut donc que les malades des deux groupes soient, à part le traitement, strictement comparables.

L'assurance de cette comparabilité, à part le traitement, est la condition "sine qua non" du jugement de causalité. C'est une étape importante de l'essai thérapeutique contrôlé.

C - CONSTITUTION DE DEUX GROUPES COMPARABLES -

Il faut rejeter certaines méthodes où l'on constitue des groupes apparemment comparables et qui sont aisément criticables. Ce sont :

a) La méthode d'observation simple où l'on compare les cas soumis à deux traitements différents de façon apparemment spontanée. En fait, les malades ont probablement eu des traitements différents parce que la gravité de leur maladie n'était pas la même.

.../

b) La méthode dite historique (46) est également condamnable pour les mêmes raisons de non-comparabilité des groupes. Dans cette méthode, on applique le nouveau traitement systématiquement à partir d'une certaine date et on compare aux résultats du traitement de l'époque antérieure.

c) La comparaison entre les traitements de deux hôpitaux n'est pas plus exacte.

On peut donc dire que les différences entre deux groupes constitués avec l'une des méthodes précédentes sont du même ordre que les modestes différences entre les effets des traitements comparés.

Les conclusions de tels essais dits comparatifs sont entâchées d'erreurs.

La seule solution convenable à ce problème est l'affectation de chaque malade au groupe "traité" par A ou B par un tirage au sort.

D - LE TIRAGE AU SORT -

C'est la seule méthode qui permette de répartir les malades dans un groupe thérapeutique de façon valable. Encore faut-il que cette affectation des malades ait été faite réellement au hasard. Pour cela, il faut se servir de "tables de nombres au hasard" pour préparer à l'avance et facilement un ordre des décisions pour chaque malade : traitement A ou traitement B.

E - NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES -

A moins que la différence entre deux traitements ne soit grande, et il n'est pratiquement pas nécessaire de faire un essai du type 2 pour le voir, un essai comparatif tel que nous l'avons décrit nécessite un grand nombre de

.../

malades. Ce nombre peut être fixé à l'avance à condition de fixer certaines données, et notamment la différence minima qu'on désire ne pas méconnaître entre les deux traitements.

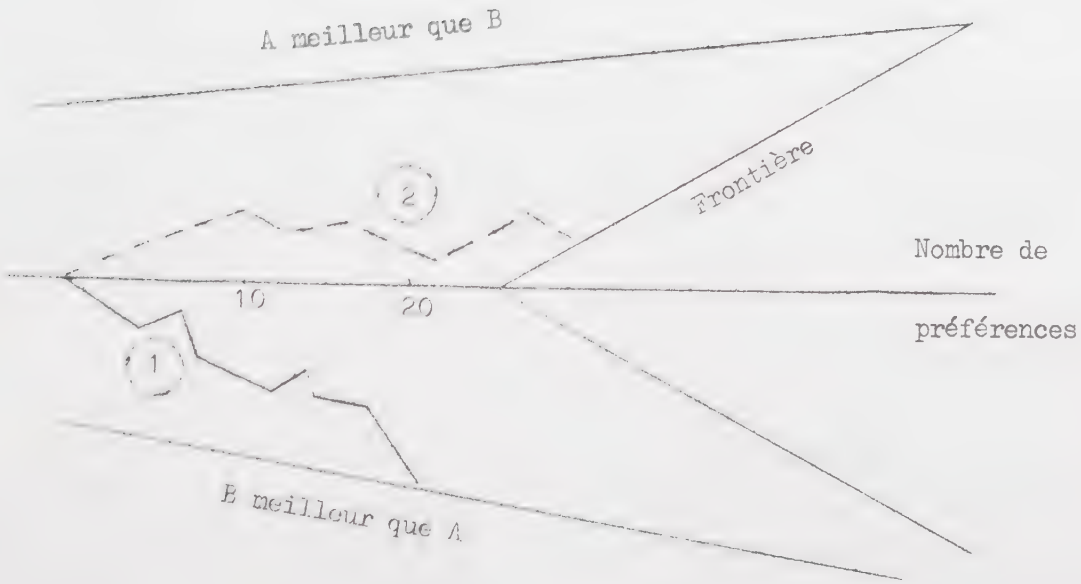
La difficulté tient à ce que ce nombre de sujets se trouve souvent trop grand pour la réalisation pratique. Pour pallier cette difficulté, deux possibilités sont offertes :

a) En premier lieu, une organisation appropriée de l'essai sur les conseils d'un statisticien. Ainsi, au lieu de réaliser un essai comparatif avec test statistique portant sur la comparaison de deux pourcentages de succès, ou de deux moyennes de survie, on pourra utiliser dans certains cas une méthode séquentielle.

Dans cette méthode (graphique n° 2), les résultats, au fur et à mesure qu'ils sont connus pour chaque malade sont portés sur un graphique ; on obtient ainsi une ligne brisée, et dès qu'elle rencontre l'une ou l'autre de deux droites tracées à l'avance, c'est que l'un des traitements surpasse l'autre de façon significative, ce qui évite de continuer l'essai. On est fixé plus tôt, et la théorie montre qu'on peut ainsi diminuer de 30 à 40 pour cent le nombre des malades nécessaires. Une remarque importante au sujet de l'utilisation de cette méthode est à faire : il faut connaître le résultat du traitement pour le premier couple de malades avant de pouvoir tenir compte du résultat du suivant et ainsi de suite.

C'est dire qu'en pratique cancérologique, la méthode séquentielle n'est à envisager que pour le traitement d'une phase aigue de leucémie où le jugement sur l'efficacité du traitement à éprouver peut être porté dans un délai de 4 à 6 semaines.

.../



Graphique représentant un type d'échantillonnage séquentiel : deux malades sont "couplés" l'un traité par A et l'autre par B et selon le résultat, on trace un segment incliné de 45° vers le succès. La ligne brisée en trait plein indique que B est meilleur que A.

Les deux obliques "frontière" à droite indiquent la limite où on arrête l'essai en concluant à l'absence de différence (ligne brisée (2) en pointillé).

b) En second lieu, il faut faire appel à la collaboration de plusieurs centres et hôpitaux. L'organisation d'un essai multicentres est certes une entreprise difficile mais c'est souvent la condition indispensable pour obtenir le nombre de malades voulu. Cette raison à elle seule suffirait à justifier la naissance des groupes coopérateurs sur lesquels nous reviendrons.

.../

III - LE PROBLEME D'ETHIQUE -

Si la description d'une méthode rigoureuse d'essais thérapeutiques peut paraître simple, l'application pratique n'est pas sans poser certains problèmes. Le plus important, surtout en cancérologie, nous parait être celui de l'ethique médicale.

Pour les essais simples, du type 1, l'essai d'une nouvelle chimiothérapie qui serait efficace est souhaitée par tous les médecins [illegible] dès lors que d'autres thérapeutiques majeures, chirurgie ou radiations ne sont plus possibles. C'est dans de telles conditions que les essais sur une tumeur maligne ou un hématosarcome peuvent être entrepris. Pour les leucémies de même, une nouvelle chimiothérapie ne doit être essayée que si la maladie est résistante au traitement classique. Encore que dans ce type d'essai, légalement, le médecin doit obtenir l'assentiment du malade, on peut cependant admettre que n'est pas transgressée la morale médicale qui veut que le médecin "est avant tout à son malade".

Pour les essais comparatifs, le problème nous paraît beaucoup plus aigu et difficile à résoudre.

Dans une maladie grave comme une leucémie ou un cancer, il paraît malaisé d'admettre que le traitement à appliquer à un malade donné, dépende d'un tirage au sort. En fait, nous pensons que la question primordiale à se poser avant même de décider d'un essai thérapeutique comparatif est : "devant un patient ayant une maladie donnée, à un stade de gravité défini, m'est-il indifférent de donner le traitement A ou B parce qu'objectivement je ne sais quel est le meilleur". Si la réponse est positive l'essai peut être discuté ; dans le cas contraire et au moindre doute de supériorité d'un traitement, il ne faut pas s'engager à faire un tel essai.

D'ailleurs, ces essais comparatifs n'ont d'intérêt que pour des gains modestes ; la supériorité manifeste d'un traitement apparaissant sans essai comparatif (ce fut le cas de la streptomycine dans la méningite tuberculeuse).

.../

Il nous faut aussi remarquer que les décisions de tels essais thérapeutiques ne sont pas prises par un seul, mais par un groupe de médecins le plus souvent. Cette décision prise à plusieurs ne doit pas rassurer ; chaque médecin doit savoir qu'il est responsable de ses malades et qu'il n'engage que lui et pas un groupe, lorsqu'il inclut un malade dans un tel essai.

- REALISATION PRATIQUE DES ESSAIS CLINIQUES -

Les services cliniques d'hôpitaux ou de centres qui font partie du "Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse" se répartissent en a) un Groupe Directeur, b) des Groupes Coopérateurs.

I - LE GROUPE DIRECTEUR : LES PREMIERS ESSAIS CLINIQUES -

Il comprend deux sections :

1°) La Section "Leucémies et Hématosarcomes. (54)

a) Elle entreprend les essais préliminaires d'un nouveau produit. Ce sont des essais du type 1 avec 15 malades qui sont faits dans un seul service hospitalier, d'où la nécessité de choisir des maladies relativement fréquentes. Dans un premier temps, on répond à la question : "la substance est-elle efficace dans telle maladie ? ". Dans un second temps, la réponse dépend de la nature chimique de la substance : a) si elle est d'une série chimique connue et efficace, les essais sont faits sur les malades résistants aux produits de ce

.../

groupe. Ainsi un antimétabolite du groupe des antipurines ne sera administré qu'aux malades résistants à la Mercaptopurine, b) si elle est d'une série chimique nouvelle, on essaie de préciser son pourcentage d'activité en l'administrant à un plus grand nombre de malades.

Ces essais ne sont faits que sur des phases évolutives de leucémies et hématosarcomes.

b) Modalités d'administration des produits :

1) La dose quotidienne et la voie d'administration sont désignées par l'étude toxicologique des produits.

Pour la plupart d'entre eux l'administration est quotidienne ou hebdomadaire avec contrôles hématologiques réguliers. Pour certains produits, l'administration est quotidienne pendant 7 jours puis on laisse le malade 7 jours au repos et l'on pratique un contrôle hématologique ; on recommence une administration de 7 jours.

2) La dose totale n'est pas fixée à l'avance. Après une certaine dose cummulative, on juge de l'effet : α) en l'absence d'effet, on cesse avant la manifestation de la toxicité, β) si l'effet désiré est obtenue, on peut arrêter, γ) si un effet non complet mais notable est obtenu, on poursuit jusqu'à la dose maximale tolérée.

c) Appréciation des résultats :

Les résultats sont classés selon les quatre possibilités suivantes :

1 Rémission apparemment complète. Ce terme signifie qu'il n'existe plus aucune manifestation clinique ou hématologique (y compris la moelle osseuse étudiée par ponction sternale) de la maladie.

2 Rémission incomplète. La phase évolutive a cédé, mais tous les symptômes n'ont pas disparu.

.../

3 - Echec non total. Ce terme signifie que la phase évolutive se poursuit malgrè la régression de quelques manifestations.

4 - Echec total. Aucun effet n'a été enregistré.

On considère comme des succès du traitement à éprouver les rémissions complètes ou incomplètes.

2°) La Section Tumeurs solides.

Son rôle est semblable à celui de la précédente section avec quelques problèmes propres aux Tumeurs solides concernant :

a) Le choix des malades :

Les traitements chirurgicaux ou par les radiations ne sont pas possibles.

b) L'appréciation des résultats :

Le critère d'appréciation le plus important est la mensuration des tumeurs pratiquée au moyen d'un pied à coulisse, que les tumeurs soient accessibles à l'examen direct ou vues sur une radiographie.

c) L'expression des résultats qui se fait de trois façons :

1 - Echec : croissance d'une ou de plusieurs masses tumorales pendant la durée du traitement même si d'autres régressent.

2 - Amélioration objective certaine : diminution des mensurations des lésions mesurables persistant au moins un mois.

3 - Amélioration objective probable : soit diminution des mensurations des lésions mesurables persistant moins d'un mois ; soit lorsque les lésions, évolutives avant le traitement, restent stationnaires pendant un temps suffisant, par exemple trois mois,

.../

après l'arrêt du traitement ; soit diminution de volume des lésions non directement mesurables, telles les lésions du larynx.

On considère que l'effet est notable lorsque le traitement a donné une amélioration objective certaine ou probable.

II - LES GROUPES COOPERATEURS -

Pour faire des essais simples du type 1 dans des maladies rares, l'obtention du nombre minimum de 15 malades demande un temps assez long si l'on s'adresse à un seul service. Il en est de même pour les essais comparatifs où le nombre de malades est toujours assez élevé. Dans ces deux cas, il faut que les essais soient faits simultanément dans plusieurs services cliniques. La réunion de plusieurs d'entre eux s'occupant d'une même localisation ou spécialité carcinologique forme un Groupe Coopérateur, tel le "Groupe Coopérateur Leucémies et Hématosarcomes", le "Groupe Cancer du Poumon" ou le "Groupe Coopérateur de Radiobiologie Clinique".

Ces groupes se réunissent de façon régulière pour a) décider de l'essai à entreprendre, b) établir le protocole de l'essai, c) discuter les conditions statistiques avec le nombre minimum de sujets nécessaires, d) s'assurer qu'un questionnaire correct éventuellement utilisable en mécanographie est rempli pour chaque malade.

Ainsi peuvent être réalisés et organisés des essais homogènes répondant avec certitude à des questions précises.

III - LA SEQUENCE DES ESSAIS CLINIQUES -

Elle est schématisée sur le tableau suivant.

Agent Chimiothérapique	Type d'essai	Fréquence de la maladie	Groupe Réalisateur
Nouveau	Essai simple de type 1	Fréquente	Section du Groupe directeur
Nouveau ou Ancien	Essai simple de type 1	Rare	Groupes Coopérateurs
Nouveau ou ancien isolé ou associé à un autre traitement	Essai Comparatif de type 2	Fréquente	Groupes Coopérateurs

- E X E M P L E S D E R E S U L T A T S O B T E N U S -

I - RESULTATS DES ESSAIS EXPERIMENTAUX -

SIGNIFICATION DES SYMBOLES UTILISES DANS LE TABLEAU SYNOPTIQUE DES TESTS NON CLINIQUES.

Test	Symbole	Signification	
I/2	0	100 γ/ml	inhibition complète
	+	10 γ/ml	"
	++	1 γ/ml	"
I/4	0	Pas d'effet	
	+	Inhibition	
I/5	0	DE_{50} = 200 μg/ml	
	+	DE_{50} = 10-200 μg/ml	
	++	DE_{50} = 10 μg/ml	
II/2 (	0	0-25 % inhibition	
II/3)	+	25-50 % inhibition	
III/4 (	++	> 50 % inhibition	
II/1 (			
III/1)	0	aucune différence	
III/2 (	+	$p < 0,05$	
III/3)	++	$p < 0,01$	
III/7	0	0-50 % inhibition	
	++	50-100 % inhibition	

.../

PRODUIT n°	I/2 KB 'in vitro'	I/5 Physarum polycephal.	I/4 VIRUS ARN	I/4 VIRUS ADN	I/3 LD_{50} mg/kg	II/2 HEMATOL. G.	II/2 HEMATOL. L.	II/1 HETEROL. PROT. av.	II/1 HETEROL. PROT. ap.	III/1 VIRUS POLIO av.	III/1 VIRUS POLIO ap.	III/2 GREFFON ALLOGEN. av.	III/2 GREFFON ALLOGEN. ap.	II/3 Sarcome 180	III/4 Ehrlich adenoc.	III/3 L 1210	III/7 Tum. spont.
00	c	o		o	255	++	++	o	++	+	++	o	++	++	+	++	
0	++	o		o	1,17	o	o	+	o	++	+	+	+	o	++	++	
1	o	o		o	280	++	++		o	o	o			o	o	++	o
2	o	o			>1000	o	o	o	o	o	o			o	o	+	o
3		o			30	+		+	+	++	+	+	o	+	o	++	
11	o	o	o	o	26	o	+	+	o	+	o	+	o	+	o	+	
12	o	o	o	o	82	+	+	o	o					o	o	+	
13	o	+	o	o	72	+	++	o	o	++	o	++	o	+	o	+	o
14	o	o	o	o	(740)	++	++	++	++	+	+	o	++	++	o	++	++
15	o	o			>6000	o	o	o	o	o	o	o	o				
16					>6.10^5 u.	o	o	o	o								
17	o	o			>5000	o	o	o	++	o	o	++	o				
18	o	o	o	o	>1000	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	
20	o	+			300	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	
21	o	+	o	+	120	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	

...

PRODUIT n°	I/2 KB 'in vitro'	I/5 Physarum polycephal.	I/4 VIRUS ARN	I/4 VIRUS ADN	I/3 LD_{50} mg/kg	II/2 HEMATOL. G.	II/2 HEMATOL. L.	II/1 HETEROL. PROT. av.	II/1 HETEROL. PROT. ap.	III/1 VIRUS POLIO av.	III/1 VIRUS POLIO ap.	III/2 GREFFON ALLOGEN. av.	III/2 GREFFON ALLOGEN. ap.	II/3 Sarcome 180	III/4 Ehrlich adenoc.	III/3 L 1210	III/7 Tum. spont.
22	++	o			5,3	+	o	+	o	o	o	++	o				
23					2400			o	o	o	o	o	o				
24					58			o	o	o	o	o	o				
25					295			o	o	o	o	o	o				
26	o	o			64	o	o							o	o		o
27	o																
30	++	++			I,29	o	o	o	o	o	o	o	o	++	o	o	o
31	o																
32		o	o	o	575	o	o	++	++	o	o	o	o	++	o	o	++
33		o	o	o	>1000	o	o	o		o		o		o	o		
34																	o
35	++	+	o	o	0,073	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
36	+	+	o	o	84	o	o								+		
37	o	o	o	o	78	o	o	o	o	o	o	++	o	o	+	o	o
38	o	+	o	o								o	o	o	o	o	
39	+	++	o	o	30,2												

.../

PRODUIT n°	I/2 KB 'in vitro'	I/5 Physarum polycephal.	I/4 VIRUS ARN	I/4 VIRUS ADN	I/3 LD_{50} mg/kg	II/2 FIBMATOL. G.	II/2 FIBMATOL. L.	II/1 HETEROL. PROT. av.	II/1 HETEROL. PROT. ap.	III/1 VIRUS POLIO av.	III/1 VIRUS POLIO ap.	III/2 GREFFON ALLOGEN. av.	III/2 GREFFON ALLOGEN. ap.	II/3 Sarcome 180	III/4 Ehrlich adenoc.	III/3 L 1210	III/7 Tum. spont.
41																o	
42	o	o	o	o	510	o	o	o	o	o	++	++	++	+	+	++	
45	o	o	o	o		o	o		o	o	o	o	o	o	o	o	
46	+	o	o	o	125	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
47	++	o	o	o	150	o	o	o	o	o	o	+	+	o	o	o	
48	++	o	o	o	115	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
49	++	o	o	o	90	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
50	o	++	+/o	o	275	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
51	+	o	o	o	525	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
52	o	o	o	o	375												
53	o		o	o													
54																	
57	o	o	o	o				o	o	+	+	o	o				
58								o	o	o	++	o	o				

.../

PRODUIT n°	I/2	I/5	I/4		I/3	II/2		II/1		III/1		III/2		II/3	III/4	III/3	III/7
	KB 'in vitro'	Physarum polycephal.	VIRUS		LD_{50} mg/kg	EMATOL.		HETEROL. PROT.		VIRUS POLIO				Sarcom 180	Ehrlich adenoc.	L 1210	Tum. spont.
			ARN	ADN		G.	L.	av.	ap.	av.	ap.	av.	ap.				
59	o	o	o	o	> 2000	o		o	o	++	o	o	o	o	o	o	o
60	o	o	o	o		o		o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
61	o	+	o	o	> 1000	o		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
62	o	o	o	o	> 2500	o		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
63	o	++	o	o						o	o	o	o	+	o	o	o
64	o	o	o	o	250					o	o	o	o	o	o	o	o
65	o	o	o	o	> 1500	o		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
66	o	++	o	o	2	o	o										
67	o	o	o	o	910	o	o	+	+	o	++	o	o	o	o	o	o
68	o	+	o	o	31,1	o	o	+	+	o	o	o	o	o	o	o	o
69	o/+	o	o	o	87	o	o			o	o	o	o	o	o	o	o
70	++	o	o	o	162	o	+	+	+	o	o	o	o	+	o	o	o
71	o	o	o	o													
72	o	o															
73	o	o															

.../

PRODUIT n°	I/2 KB 'in vitro'	I/5 Physarum polycephal.	I/4 VIRUS ARN	I/4 VIRUS ADN	I/3 LD_{50} mg/kg	II/2 HEMATOL. G.	II/2 HEMATOL. L.	II/1 HETEROL. PROT. av.	II/1 HETEROL. PROT. ap.	III/1 VIRUS POLIO av.	III/1 VIRUS POLIO ap.	III/2 GREFFON ALLOGEN. av.	III/2 GREFFON ALLOGEN. ap.	II/3 Sarcome 180	III/4 Ehrlich adenoc.	III/3 L 1210	III/7 Tum. spont.
74	o	o			135			o	o	o	o	o				o	
75	o				20ml												
76					62	o	o	o	o	+	+	o	++	o		o	
77					83			o	o	o	o	o	o	o	o	o	
78					0.95	o	o			o	o	o	+	o	+	++	
79	o																
80	o				275			o	o	o	o			o		o	
81					100			+	o	o	o	o	o	o		o	
82		o															
83		o	o	o	861	o	o	++	o	o	+	o	o	o	o	o	
84		o	o	o	>2000	o	o	o						o	o		
85		o	o	o	>2000	o	o							o	o		
90	o	+	o		228	o	o							o	o		
91		o	o	o	>1000										+/o		
92		o	o	o	>1000	o	o					+		o			
93	++	++	o	o	6,58									o	o		

.../

PRODUIT n°	I/2 KB 'in vitro'	I/5 Physarum polycephal.	I/4 VIRUS ARN	I/4 VIRUS ADN	I/3 LD_{50} mg/kg	II/2 HEMATOL. G.	II/2 HEMATOL. L.	II/1 HETEROL. PROT. av.	II/1 HETEROL. PROT. ap.	III/1 VIRUS POLIO av.	III/1 VIRUS POLIO ap.	III/2 GREFFON ALLOGEN. av.	III/2 GREFFON ALLOGEN. ap.	II/3 Sarcome 180	III/4 Ehrlich adenoc.	III/3 L 1210	III/7 Tum. spont.
94																	
95	o	o			> 1200			o	+	o	o	o	o	o	o	o	
96	o	o			845												
97	o				725												
99					0,945					o	o	o	o	o	o	±	
100					148			+	+	o	o	o	o				
101								o	o	o	o	o	o			o	
102								o	o	o	o	o	o			o	
103	o	o			362									o	o		
104	o				470												
105	o	o			> 1000	++	++							++	o		
106	±				6,8												
107	+				55	o	o							o	o		
108		o			21,1	o	o							o	o		
109	o																
110		o															

.../

- LES RESULTATS DES ESSAIS CLINIQUES -

Certains essais sont maintenant terminés. Ainsi a pu être étudiée l'efficacité d'une méthylhydrazine dans la maladie de Hodgkin et dans certains hématosarcomes (40).

De nombreux essais sont en cours au sein des Groupes Coopérateurs. Citons à titre d'exemple les essais qui se déroulent actuellement au sein du Groupe "Coopérateur Leucémies et Hématosarcomes".

Nature de la Maladie	Type de l'Essai
Leucémie Aigue Monoblastique	Essai de type 1 par une Polychimiothérapie.
Leucémies Aigues Granulocytaires	Essai de type 2, séquentiel ; comparaison entre Méthylglyoxal-bis-guanyl-hydrazone (Méthyl-GAG) seule et Méthyl GAG + 2-Hydroxystilbamidine.
Polyglobulie de Vaquez	Type 2 : comparaison de l'évolution selon que l'on traite par P 32 ou Chimiothérapie au Myleran.
Myélome	Type 1 par Vincaleucoblastine au long cours.

-=-=-=-=-

C O N C L U S I O N

Nous décrivons, dans cette thèse, une chaîne de tests expérimentaux et cliniques capables de déceler l'efficacité anticancéreuse de composés chimiothérapiques, et analysons les conditions statistiques de leur validité.

Cette chaîne de tests a été établie et expérimentée pendant trois ans sur plus de 100 produits par le Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse et par ses groupes coopérateurs, dont les Groupes "Leucémies et Hématosarcomes" et "Radiobiologie Clinique", au sein desquels nous sommes chargés du secrétariat et de l'interprétation statistique.

La chaîne des tests expérimentaux comporte : a) une étape de tests "in vitro" et l'étude de la dose létale 50 ; b) une seconde étape qui se résume en un seul test : l'étude de l'effet sur la leucémie 1210, (cette tumeur ayant été choisie parce que tous les produits actuellement efficaces sur les cancers humains, sauf deux, sont efficaces sur la leucémie 1210) ; c) l'étude de l'effet des produits sur diverses tumeurs, carcinomes et sarcomes greffés, tumeurs virales, et sur les réactions immunitaires ; d) la quatrième étape se résume en la pharmacologie préclinique.

Les essais cliniques sont de deux types en ce sens qu'ils répondent à deux questions : a) le premier type de tests pose la question suivante : "Tel produit est-il efficace dans telle maladie ? " On limite à quinze le nombre des sujets chez lesquels il est appliqué. b) le second type de tests répond à la question suivante : " Tel produit est-il plus efficace que tel autre produit dans telle maladie, ou telle variété d'administration est-elle plus efficace que telle autre ? ".

.../

Les essais du type 1 sont conduits pour les maladies fréquentes par le Groupe Directeur du G.E.C.A. et, pour les maladies rares, par les Groupes Coopérateurs.

Le second type d'essais n'est conduit que par les Groupes Coopérateurs, car il demande, pour des raisons statistiques, un très grand nombre de malades, étant donné la nécessité de comparer deux groupes.

Chacune de ces étapes nécessite le recours à la méthodologie statistique aussi bien dans la chaîne des tests expérimentaux que dans les essais cliniques de type 1 et 2.

Le détail de cette méthodologie a été donné à l'occasion de l'étude de l'effet sur la Leucémie 1210. On a montré comment elle intervenait tant dans l'organisation de l'expérience que dans l'analyse des résultats.

-=-=-=-=-=-

Vu, le Président de Thèse :

Pr Pierre DENOIX

Vu, le Doyen de la Faculté :

Pr Georges BROUET

Vu et Permis d'Imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris :

Jean ROCHE

R E F E R E N C E S

ESSAIS EXPERIMENTAUX

1 - J.-L. AMIEL et al. - Aspects histologiques des lésions induites dans les organes hématopoïétiques par l'injection à des hybrides FI irradiés de cellules ganglionnaires d'une des lignes parentales. Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1960, 5, 20.

2 - J.-L. AMIEL et al. - Injections à des souris nouveau-nées de cellules hématopoïétiques homologues de donneurs adultes ou embryonnaires. Fréquence de la greffe érythroblastique et de la "runt disease". Experientia 1960, 16, 563.

3 - J.-L. AMIEL et al. - Etude des agglutinines sériques contre un antigène bactérien chez des radiochimères hématologiques immunisées contre l'antigène avant l'irradiation. N. Rev. Tr. Hematol., 1961, 1, 65.

4 - J.-L. AMIEL et al. - Aspects morphologiques des cellules immunologiquement compétentes au cours des réactions de greffes allogéniques. N. Rev. Fr. Hématol., 1961, 1, 887.

5 - J.-L. AMIEL et al. - Mise au point de tests permettant de déceler l'effet des produits antimitotiques sur les réactions immunitaires. Immunology, 1964.

6 - J. BECKER et coll. - Growth inhibition of physarum polycephalum for the evaluation of chemotherapeutic agents. Cancer Research, 1963, 23, 10.

7 - C. CHOQUET, E. ROSENKOVITCH, O. HALLE-PANNENKO, M.-F. CROCHET, I. FLORENTIN. Comparaison des effets de l'association irradiation totale méthyl-hydrazine et de l'irradiation totale seule pour l'éradication de la leucémie greffée L 1210 traitée par immunothérapie adoptive. Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1966, 3, XI, 298-301.

.../

8 - C.N.S.C. - Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer Chemotherapy Reports, 25.12.62 1-59.

9 - S. GARATTINI et al. - Ricerche su alcuni antimitotici : interferenze su particolari processi metabolici ed attivita nei confronti del tumore di Walker trapiantato in sedi diverse. Atti Simposio sugli antibiotici, Sanremo 10-11 giugno 1955, p. 55.

10 - S. GARATTINI et al. - A procedure for the evaluation of specific effects of antitumor drugs. Symposium on Biological Approaches to Cancer Chemotherapy. Held in Louvain, June 1960, Published by Academic Press Inc. London Ltd., p. 167.

11 - S. GARATTINI et al. - An attempt to evaluate effects of antitumoral drugs. Cancer Chemotherapy Reports, 1961, n° 13, p. 9.

12 - A. GOLDIN et coll. - Essais expérimentaux d'une chimiothérapie qt prévision de son efficacité clinique. Cancer Chemotherapy Reports, vol. 50, n° 4, mai 1966, 173-218.

13 - A. LEONARDI et al. - Attivita della sarcolisina, della sarcomicina della carzinofillina su cellule tumorali coltivate "in vitro". Giorn. It. Chem. 1956, 3, 563.

14 - A. LEONARDI - Attivita di derivati aminopirazolpirimidinici sulla crescita di cellule tumorali umane coltivate "in vitro" ; studio sui rapporti tra attivita e struttura chimica. Giorn. It. Chemioter., 1958, 5, 41.

15 - A. LEONARDI, L. MORASCA - Méthode rapide pour l'évaluation quantitative de l'activité cytotoxique en culture de tissus par une numération électronique des cellules. Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1965, n° 7, vol. X, pp. 759-760.

16 - P. LOUSTALOT et al. - Characterization of the specificity of action of tumor inhibiting compounds. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, 76, 838.

17 - R.-H. MARTIN - Synthèse d'antimétabolites potentiels des bases puriques et pyrimidiques : Bull. Soc. Chim. Belges, 69, 177, 1960. Helvetica Chimica Acta 1959, 42, 485 ; 1959, 42, 1317 ; 1961, 44, 299.

.../

18 - G. MATHE, J.L. BINET et coll. - La tolérance acquise et la tolérance naturelle à l'égard des substances antigéniques définies. Colloques internationaux du C.N.R.S., 25-28 juin 1962.

19 - G. MATHE, D.L. KLIN - Valeur de la formule leucocytaire. Revue d'Hématologie, 15, n° 4, 1960, 352-355.

20 - O. MUHLBOCK - Experimentele chemotherapie van tumoren. Jaarboek Kankeronderzoek. Kankerbestrijding 1956, 6, 165.

21 - K. MUNK, W. ACKERMANN - Some Peoperties of Herpes simplex Virus. J. of Immunol. 71, 426-430, 1953.

22 - K. MUNK - Zur Poliomyelitisschuntzimpgung mit aktivem, abgewandeltem Virus. Med. Klinik 18, 806-809, 1959.

23 - K. MUNK, D. DONNER - Cytopathischer Effekt und Plaque-Morphologie verschiedner Herpessimplex-Virus-Stämme. Arch. ges. Viruforsch. 1963 in press.

24 - W. SACHSENMAIER et al. - The effect of 5-fluorodeoxyuridine on synchronous mitosis in Physarum Polycephalum. Proc. Am. Soc. Cell. Biol., 1961, 1, 186.

25 - W. SACHSENMAIER et al. - Studies on the relation of DNA and RNA synthesis to synchronous mitosis in Physarum Polycephalum. Proc. Am. Ass. Cancer Res., 1962, 3, 357.

26 - W. SACHSENMAIER et al. - The effect of 5-fluorouridine and actinomycin D on synchronous mitosis on Physarum Polycephalum (in preparation).

27 - D. SCHWARTZ - Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Editions médicales Flammarion.

28 - M. SEKIGUCHI, A.-M. MERY, C. BREZIN, W.-E. VAUBEL. Une méthode simple et rapide de greffe de peau chez la souris. Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1966, n° 2, XI, 203-205.

.../

29 - P. STRAULI et al. - Ueber ein spontanes, transplantables lymphoreticulocytares Sarkom des Goldhamsters. Z. Krebsforsch., 1960, 63, 503.

30 - D.W. VAN BEKKUM et al. - Mechanisms of chemical protection against ionizing radiation in living organisms. In : Immediate and low level effects of ionizing radiations Benice, June 1959, p. 115.

31 - D.W. VAN BEKKUM et al. - The mechanism of radiation protection by histamine and other biological amines. J. Rad. Biol. 1959, 1, 5.

32 - D.W. VAN BEKKUM et al. - Treatment of total body X-irradiated monkeys with autologous and homologous bone marrow. J. Natl. Cancer Inst., 1961, 27, 53.

33 - D.W. VAN BEKKUM - La radiosensibilisation chimique. Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1964, vol. IX, pp. 993-996.

34 - W. VERLY et al. - Préparation de thymidine tritiée et son emploi pour l'étude, par la méthode autoradiographique, de la synthèse de l'ADN dans les cellules en culture. 2ème Conf. Intern. Genève, p. 323, 1958.

ESSAIS CLINIQUES

-=-=-=-=-=-

35 - Sir A. BRADFORD HILL - Ethique médicale et essais contrôlés. British Medical Journal, 20 avril 1963, pp. 1043-1049. Traduction.

36 - C. O. BRINDLEY - Essais préliminaires de chimiothérapie chez des malades atteints de tumeurs solides. Méthodologie. Cancer Chemotherapy Reports, n° 32, octobre 1963, pp. 27-33.

37 - H. DOWLING - Essais de produits thérapeutiques sur l'homme : Responsabilités. J. of the Amer. Med. Assoc., 18 janvier 1964, vol. 187, pp. 212-215.

38 - H. DOWLING - Comment les médecins praticiens utilisent-ils les nouveaux produits ? J.A.M.A., vol. 185, pp. 233-236, 27.7.63.

39 - E. A. GEHAN - The determination of the number of patients required in a preliminary and a follow-up trial of a new chemotherapeutic agent. Journal of Chronic Diseases, Vol. 13, n° 4, pp. 346-353, april 1961.

40 - G. MATHE, L. BERUMEN, O. SCHWEISGUTH, M. SCHNEIDER, J.-L. AMIEL, A. CATTAN, L. SCHWARZENBERG, G. BRULE. Essai de traitement de la maladie de Hodgkin et de divers hématosarcomes et leucémies par une méthyl-hydrazine. Etude portant sur 100 patients. Presse Médicale, n° 28, 6 juin 1964, pp. 1641-1644.

41 - G. MATHE, M. SCHNEIDER, A. CATTAN, J.-L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG, J.R. SCHLUMBERGER. Essai de traitement par le bromhydrate de 1-Méthyl-2-p-Allophanoyl-Benzyl-Hydrazine de la maladie de Hodgkin et de divers hématosarcomes. Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1964, n° 9, vol. IX, pp. 990-992.

.../

42 - G. MATHE et al. - Essai de traitement de la maladie de Hodgkin et d'autres affections réticulo-histiocytaires malignes par la vincaleucoblastine. N. Rev. Franç. Hém. 1962, 2, 908.

43 - G. MATHE et al. - Greffe de moelle osseuse après irradiation totale et administration d'un antimitotique pour réduire la fréquence du syndrome secondaire et ajouter à l'effet antileucémique. C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 3603.

44 - G. MATHE et al. - Essai de traitement par la leucocristine de la leucémie aigue lymphoblastique et du lymphoblastosarcome. Presse Méd. 1963, 71, 529.

45 - R. PATERSON - Clinical trials in malignant disease. Part I. Principles of random selection. Journal of the Faculty of Radiologists, Vol. IX, n° 2, april 1958, pp. 80-83.

46 - D. SCHWARTZ - Les essais thérapeutiques cliniques. Masson et Cie, Editeurs.

47 - D. SCHWARTZ - Comment juger l'effet d'un traitement. J. de Chir., 1961, 82, 209.

48 - H.E. SKIPPER - Formulation and evaluation of chemotherapeutic agents. Cancer Chem. Abst., sept. 1963, p. 620.

49 - H.-J. TAGNON et al. - Action de la 6-mercaptopurine dans 41 cas de leucémie aigue chez l'adulte. Rev. d'Hématologie, 1958, 13, 2.

50 - H.-J. TAGNON et al. - Chemotherapy of cancer. First report of an expert committee. World Health Organization Technical Report, Series n° 232, 1962.

51 - H.-J. TAGNON et al. - Le traitement hormonal du cancer du sein en phase avancée. Comparaison des résultats obtenus au moyen de la delta-1-testololactone et du propionate de testostérone. Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques, 1962, 7, 1067.

52 - H.A. VAN GILSE et al. - Clinical application of long-acting testosterone compounds. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1952, 96, 314.

.../

53 - H.A. VAN GILSE et al. - Long term treatment with coritcosteroids of patients with metastatic breast cancer. Cancer Chemotherapy Reports, 1962, 16, 293.

54 - Groupe Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse. Protocole pour les essais cliniques de traitements des leucémies et hématosarcomes. Journal Européen de Chimiothérapie, vol. 2, 1966, pp. 85-88.

55 - Institut Gustave-Roussy - Carcinologie. Editions Médicales Flammarion, 1 Vol.